

**「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」研究領域 領域活動・
評価報告書
－2019 年度終了研究課題－**

研究総括 岡田 清孝

1. 研究領域の概要

本研究領域では、フィールドにおける環境変化に適応し、安定的に生育する植物を分子レベルから設計するための次世代基盤技術の創出に関する研究を推進します。具体的には、植物の遺伝子(群)の挙動と表現型との関係性を時間的・空間的に定量的に解析し、環境に適応する植物の生理システムの包括的な理解を目指します。また、環境応答機構のモデルの構築やバイオマーカーなどの同定を行い、新しい植物生産の基盤技術を構築します。さらに、環境応答に関係する複雑な遺伝子(群)・遺伝子型の人工設計のための新たな遺伝的改良技術を開発し、多様な植物への応用展開を目指します。

研究領域の推進では、植物の環境応答機構の定量解析の観点から、植物の単一遺伝子の応答機構ではなく、多因子および QTL による複雑な応答機構の解明に主眼を置きます。また、各種大規模データの解析やモデル化、およびその実証の観点から、植物科学のみならず情報科学、工学などの多様な分野の個人研究者の参画を促します。さらに、本研究領域は戦略目標の達成に向けた成果創出を最大化すべく、CREST 研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解明と応用に向けた基盤技術の創出」やさきがけ研究領域「情報科学との協働による革新的な農産物栽培手法を実現するための技術基盤の創出」とも連携した運営を行っていきます。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：9 件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出(フィールド植物制御)」領域に設けた選考委員 11 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <https://www.jst.go.jp/pr/info/info1211/index.html>(第 1 期))の他、以下の点を重視した。
 - ① 植物の環境応答機構の定量解析に関する研究
 - ② 環境応答機構に関する数理モデル構築やバイオマーカーの開発に関する研究
 - ③ 遺伝子改変と遺伝子導入の新たな技術に関する研究

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザーの内 3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	84 件	25 件	10 件

備考:

- 1) 2016 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
 - ・横井 彩子研究者



ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

5. 研究実施期間

2016年10月～2020年3月

6. 領域の活動状況

・領域会議：7回

第4回領域会議は、さきがけ「情報協働栽培」と合同で開催

・研究総括の研究実施場所訪問：15回

・JST CREST/さきがけ植物4領域合同シンポジウム「植物の環境適応戦略をひもとくーJST 植物科学のいまー」(2016年10月、東京)を開催

・植物関係領域合同若手研究会(2018年10月、沼津)を開催

・日本育種学会 第61回シンポジウムにおけるワークショップ「フィールドにおける生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」(2019年9月、岡山)を後援

・International Symposium on the Future Direction of Plant Science by Young Researchers(2019年12月、浜松)を主催

・プロジェクト横断型公開シンポジウム「植物のゲノム編集基盤技術開発の現状と展望」(2020年2月、東京)を共催

・第61回日本植物生理学会年会シンポジウム「植物制御技術の高度化と実用」(2020年3月、大阪)を後援

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

2019年11月 評価会開催

2020年1月 研究総括による事後評価

2020年2月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

(1)研究課題等の研究目的の達成状況

(2)研究実施体制及び研究費執行状況

(3)研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

※該当する成果がある場合には「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さきがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

9. 評価結果

2019年度に第2期生9名の研究課題が終了した。第2期生のうち1名はライフイベントにより研究を一時中断したために、来年度に終了の予定である。本領域は、植物が持つ環境応答能力を定量的に解析し、表現型を予測するバイオマーカーの開発や生育・環境応答予測モデルの構築など、育種開発や栽培技術の高度化に向けた新たな手法を見出すことを目標としている。植物基礎科学、情報科学、農学(育種学、栽培学)など異なった研究分野の連携が重要であることから、いずれかの研究分野に一定の実績があり、その基盤の上に新たな研究分野を取り込む意欲を持った挑戦的な研究課題の提案を採択した。採択課題の大部分はさきがけ研究の目的を十分に達成する研究成果をあげたが、当初目標に対して思い通りの結果が得られなかった課題についても、それぞれの研究者が研究方針の転換や新規手法の取り込みなどの努力を重ねた結果、今後の発展が期待される新たな知見を数多く得ることができた。領域会議などの場においては、アドバイザーや総括のみならず研究者が互いに批評・助言することによって研究のレベルが向上し、領域が活性化した。また、同時期に発足したCREST「植物頑健性」及びさきがけ「情報協働栽培」の領域会議への参加や、共同で研究会を行うなどの密接な研究連携を進め、シナジー効果を示すことができた。さらに、本さきがけ研究領域の担当が交代した機会に改めてサイトビジットを行い、研究の進展状況や研究環境を確認し要望を聞くことができたことも、さきがけ研究者の研究遂行に役立ったと思われる。研究期間の間に新たな上級ポストの獲得や受賞に至った研究

者も多く、さきがけ研究のもう1つの主目的である将来の主導的研究者の養成についても一定の役割を果たせたと考えている。

本年度終了の9課題の中では、高岡研究者、藤井研究者の2氏の研究は特に優れたものと評価する。高岡研究者の「植物ホルモン活性のあいまい制御による環境応答バイオマーカー群の機能解明」においては、ジャスモン酸の受容体に結合するジャスモン酸構造類縁体を合成し、多様なホルモンの活性の中から特定の活性のみを誘導する分子を見出すなど、分子設計と *in vivo* での実証によって複雑な植物ホルモン活性の切り分けと受容体サブタイプの特定を可能にした。論文発表も多く、分子設計による生理活性制御の新たな方法を示した研究として国際的にも評価が高い。藤井研究者の「遺伝育種の拡張に向けた種間隔離メカニズムの解明」は、自然界において異なる種の間での受精を妨げる種間障壁の分子機構を精力的に解明し、異種の花粉排除に広く関わる種間障壁遺伝子 *SPRI* や、花粉が雌蕊先端に接着して花粉管を伸ばす際に雌蕊先端の細胞からの水分供給を引き起こす「同種シグナル因子」を世界に先んじて見出すなど、地道な研究の積み重ねによってこの分野に新たな展望を切り開いた独自性の高い研究である。これら2課題の詳細については、以下の個別課題の評価の項目で述べる。

1. 泉 正範 研究者「光合成老化の環境適合を可能にする分子デザインの創出」

泉研究者は、作物の収量と品質を規定する最大の要因である光合成能力を高く調整する手法として、葉緑体の老化分解過程に着目して研究を深化させた。老化した葉緑体を細胞内から除去する機構には、葉緑体を部分的に分解するオートファジー(RCB 経路)に加え、葉緑体を丸ごと分解するオートファジー(クロロファジー)の2経路が存在することを明らかにし、それぞれの経路に働く「光合成老化関連遺伝子」を見出した。コメのデンプン量は最上位の葉(止め葉)における光合成活性に大きく依存することが知られているが、泉研究者は、老化関連遺伝子を欠損したイネでは、止め葉での葉緑体老化が抑制され、光合成活性が高く推移することを確認した。この結果は、光合成老化関連遺伝子を制御することによって、作物の光合成活性を維持しつつ収量の増大を図る戦略の実用化に向けた基盤になると考えられる。さらに、ケミカルバイオロジーの手法によって、葉緑体のオートファジーを抑制する化合物を複数見出し、遺伝子改変に依存しない作物の品種改良を目的とした光合成老化の制御手法の開発に向けた手がかりを得たといえる。これらの研究によって葉緑体老化の制御が光合成活性の主要な要因であることが明確になったことは大きな成果である。葉緑体老化による光合成活性の最適化という新たな研究分野を育て、自らその基盤を整えてきたことを高く評価する。

研究期間の途中で移動があり、実験圃場が遠くなるなどの影響があったが、新たな研究拠点においてもケミカルバイオロジーの導入など研究が順調に展開していることは喜ばしい。今後、水田における多様な自然環境条件の下での検定が必要であるが、葉緑体老化の制御による作物生産の量と質の向上に向けた基礎研究の推進を期待する。

2. 井上 晴彦 研究者「土壌細菌による鉄欠乏植物を救出するメカニズムの分子基盤解明」

植物と細菌類との間に見られる相互作用には、拮抗的に働く病原微生物の他に、相互依存的に作用する Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) の存在が知られており、PGPB は有用な生物農業資材としても注目されている。世界的に広く分布するアルカリ性の土壌においては、鉄イオンが土と結合して植物が吸収できないために、鉄欠乏によって作物が育成不良になることが知られているが、例外的に高収量を得る農場も存在する。井上研究者は、このような農場の土壌中には鉄イオンの吸収を助ける PGPB が存在すると考え、イタリアのブドウ農園の土壌中から、数十種類の PGPB を単離した。その中の一種、*Shpingobacterium* 属の新規の細菌 PGPB237 株について解析を進め、この細菌が土中に分泌するキレート物質が鉄イオンと錯体を形成し、植物(シロイヌナズナ)がその鉄錯体を吸収して利用すること、鉄イオントランスポーターである AtYSL1 によって吸収されることを明らかにした。AtYSL1 は鉄欠乏状態の植物において、この細菌の存在下でのみ強く誘導されることから、植物が細菌に反応してトランスポーター遺伝子の発現を誘導し、他方、細菌が植物に呼応してキレート物質の産生と分泌を促すという、協調的な相互作用の存在が明らかになった。また、アルカリ性土壌でイネを育て、この細菌を土中に入れると草丈、クロロフィル含量共に有意差が見られたことから、PGPB を用いてアルカリ性土壌における鉄欠乏から植物を救う手法がイネ以外の多くの作物にも応用できると期待される。さらに、井上研究者は日本のアルカリ性土壌にも PGPB としての活性を示す細菌が存在することを示し、生物農業資材としての実用化に向けた努力を続けている。PGPB237 株から分泌されるキレート物質の分子構造の解析や、鉄イオンの吸収・転流の機構などは未解明であり、野外圃場での効果検定など重要な課題が残っているが、本研究の成果は、農業利用に不適とされてきたアルカリ性土壌での農業生産向上に役立つ

基盤を築いたものと評価する。

3. 神谷 岳洋 研究者「フィールドでの非破壊元素動態モニタリング技術の確立と時空間動態解明」

圃場における作物育成の状況、特に各種元素の作物個体内の動態を的確に把握するためには、圃場で利用可能な非破壊モニタリング技術を確立することが必要である。神谷研究者は、新たに開発されたハイパースペクトルカメラによるスペクトルデータから高解像度で元素動態を捕捉する手法を開発することを目的として研究を行った。ハイパースペクトルカメラによる効果的な撮影条件には制限が多く、圃場におけるデータ取得は困難であることが明らかになったが、温室内で育成したトマトを用いたスペクトルデータから 10 数種の元素濃度を推定するモデルを構築し、ICP-MS による元素分析の実測データとよく合うことを示した。また、ハイパースペクトルカメラを用いて、特定の元素が欠乏したトマトに欠乏症状が顕在化する前に欠乏による異常を判別できることを示した。これらの成果は、作物個体内の無機栄養分の移動と蓄積の状態を把握し、欠乏や過剰による生育異常が明確になる前に対応することを可能にする非破壊モニタリング手法の実践的な基盤となるものである。また、植物体内への元素の取り込み・転流・蓄積に関わる遺伝子の同定についても研究を進めたことも評価する。

ハイパースペクトルカメラによるスペクトル解析とその利用は多くの可能性を持つ分野であり、今後の展開が期待される。野外の圃場での利用については、カメラの小型化とともに撮影条件の検討なども必要であろう。研究を進める道筋をよく考えるとともに、論文による成果の発表を急いでほしい。

4. 高岡 洋輔 研究者「植物ホルモン活性のあいまい制御による環境応答バイオマーカー群の機能解明」

植物ホルモンが示す多様な活性は複数の受容体サブタイプが分担しているため、個々の応答に関わる受容体サブタイプが同定できれば、1つの反応のみを亢進させ他の反応を抑制するなどの操作が可能になると考えられる。高岡研究者は、ジャスモン酸の受容体に結合するリガンド分子の定量的なスクリーニング法を開発し、合成したジャスモン酸の構造類縁体の中から生長阻害を引き起こすことなく、病原菌感染への抵抗性を示す分子を見出した。三次元立体構造解析から、この分子はシロイヌナズナが持つ共受容体(COII/JAZ1-13)13種類のうち2種類とのみ結合すること、突然変異体による遺伝解析から JAZ9 サブタイプが病原菌抵抗性の獲得に主要な役割を持つことなど、ジャスモン酸シグナル伝達機構における重要な成果が得られた。これは、人工合成した化合物によって植物の生長と防御のトレードオフの関係が解消できる可能性を示唆するものとして新規性の高い重要な結果である。また、高岡研究者は、蛍光色素を用いたリガンドと受容体との定量的結合活性アッセイ系を開発して、一連の解析に用いたが、この手法はハイスループット化可能なリガンドのスクリーニング系として今後の活用が期待される。さらに、JAZ9とJAZ10に選択的なリガンドとして見出された新規化合物NOPhは、植物の生長阻害を引き起こすことなく、病原菌耐性遺伝子の転写を選択的に活性化するが、生体内ではJAZ10ではなくJAZ9を介して反応が進むことが明らかになった。

高岡研究者によるこれらの成果は、曖昧ではあるが一定程度のサブタイプ選択性を持つリガンドを三次元結合シミュレーションなどの手法を用いて開発し、遺伝解析と組み合わせることによって、植物ホルモンがもつ多様な生理活性の中から特定の活性のみを制御する受容体サブタイプを同定することが可能であることを実証したものである。分子設計と *in vivo* での実証によって複雑な植物ホルモン活性の切り分けと受容体サブタイプの特定ができたことは、化学生物学の新たな成果として高く評価する。論文発表も多く、分子設計による生理活性制御の新たな方法を示した研究として国際的にも評価が高い。

本研究において、ジャスモン酸の活性の中で、これまで分離して操作することが困難と考えられてきた植物の生長と防御の活性を小分子リガンドによって区別して制御する手法が示されたことによって、他の植物ホルモンや環境応答シグナル分子に対する選択的リガンド創生への展開を期待する。

5. 田中 佑 研究者「非定常光環境におけるイネ光合成の遺伝的制御の包括的解明」

秒単位で光強度が大きく変動する野外の変動光条件下では、弱光から強光への変化した際の光合成の立ち上がりの速度が積算光合成量に影響する。田中研究者は、イネ普及品種のコシヒカリに比して多収品種のタカナリでは、光合成誘導反応が強いことを見出し、両品種の交雑から得られた染色体断片部分置換系統群(CSSLs)を用いた遺伝学解析から、12番染色体の長腕に光合成誘導反応を増強する QTL を同定して *qRaise1*(*Rapid Induction Response 1*)と命名した。*qRaise1* は既知の最大光合成能に関する QTL とは別の領域に検出された新規な QTL であった。光合成誘導反応は複雑な生理現象であり、関与する遺伝的要因も多数にわたると想定されていたが、*qRaise1* が主働的な QTL であることが明確になった。*qRaise1* を導入した品

種では、光合成誘導反応時の光合成速度、気孔コンダクタンス、葉肉コンダクタンス、電子伝達速度がいずれも向上していたことから、*qRaise1* は複数の光合成プロセスに影響する遺伝的要因と考えられる。この QTL を規定する遺伝子は現在同定中であるが、この QTL を用いて光合成量を増大したイネ品種開発の可能性を示す大きな成果である。さらに、世界のイネの多様性品種パネル、コアコレクションについて光合成誘導反応を解析し、タカナリよりも優れた光合成誘導反応を示す系統を複数見出した。これらの遺伝的変異は、光合成誘導反応機構の解明と新たな品種作出のために重要な遺伝資源であると期待される。

また、田中研究者は、光合成誘導反応を組み込んだ光合成シミュレーションモデルを構築し、圃場において実際に観察された1日の光強度変化を入力したところ、光合成の立ち上がりの遅れによって、潜在的な炭素固定量の最大 30%程度を損失しているとの結果を得た。しかし、光合成誘導反応の自然変異を育種的に利用できたと仮定すると、この損失は大幅に低減し、フィールド環境におけるより効率的な物質生産が可能になると予測された。さらに、光合成測定装置内で野外の変動光条件を人工的に再現し、コシヒカリとタカナリの光合成動態を測定したところ、タカナリは午前中から昼頃にかけて非常に高い光合成速度を示したが、午後になると品種間差が小さくなり、最終的には差が消失した。これらの結果は、光合成誘導反応を改良することによって野外の変動光条件に適したイネを設計し産出できることを、理論・実測の両面から確認したものである。

田中研究者の研究は、既に飽和しているとの予想もあった栽培イネの光合成能力増強に関わる遺伝子を独自の視点から見出し、育種改良への道を開いたものであり高く評価できる。遺伝子組換えに依存しない高収量イネの育種に向けた研究の進展を期待する。

6. 東樹 宏和 研究者「頑健な植物共生システムの設計に向けた「コア共生微生物」探索技術の開発」

野外において植物は土中の細菌や真菌と共生することによって健全に生育すると考えられており、「内生菌」とよばれる菌類が、「コア共生微生物」として共生叢全体の動態を制御している可能性がある。東樹研究者は、日本列島全域の様々な生態系における野外調査から膨大なデータを得て理論生態学的なビッグデータ分析によって「コア共生微生物」を特定し、生態系から収集した微生物コレクションを用いて植物種苗への接種試験を行い、「コア共生微生物」が作物の生長促進などの効果を示すことを実証した。

日本列島全域から植物根のサンプルを採集し、DNA メタバーコーディングによって得られた膨大なデータを基に生物間の関係性を探索する新手法を開発して、150 種の植物と 8080 種の真菌で構成される「地下共生ネットワーク」を提唱した。この生物叢分析技術によって見出された「コア共生微生物」は、森林や草原において多数の微生物種で構成されるシステム全体を安定化し、野外環境下における生物/非生物ストレスに対する植物の抵抗性を高めていると想定される。また、ダイズ根こぶ線虫を捕食する 5 種の菌類からなるネットワークが存在すること、細菌叢よりも真菌叢において、農法や作物品種間による違いが大きいことを示した。ついで、東樹研究者は、農林業における活用として、植物の健全な育成を促す「地下共生ネットワーク」を構築するために、種苗に接種する適切な「コア共生微生物種」を選び出すための指標を提案した。さらに、植物根から収集した 3000 菌株のコレクションの中から内生真菌や土壌真菌を選択して植物体への接種試験を行い、実際に植物の生育を促進することを確認した。

東樹研究者による一連の研究は、「地下共生ネットワーク」の発見から始まり、野外調査・DNA メタバーコーディング・理論生態学的解析・接種試験を組み合わせた精力的な研究によって、農業上有望な「コア共生微生物」の選択手法を提案し、その効果を実証するまでに至ったもので、質の高い論文を積極的に発表しており、研究者としての活動は質量ともに高く評価できる。今後の活躍を期待する。

7. 晝間 敬 研究者「共生微生物群の機能解析とその活用による植物生長促進技術の開発」

植物と共生する微生物には病原寄生菌とも近縁のものが多く、相反する行動のように考えられる共生と寄生についての相違を明確にする分子機構の解明は遅れている。晝間研究者は、アブラナ科植物の根に無病徴感染し、植物の生長を促す共生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) が、土壌の環境によって逆に植物生長を阻害する場合があることを見出し、この系を用いて土壌・根圏微生物と植物間に見られる協調的相互関係と競争的相互関係における分子機構を解析した。まず実験に適した日本由来の *Ct* 株を単離し、*Ct* 株を接種するとコマツナなどの生長が著しく促進されること、実験前に土壌微生物を滅菌した区と比較して、滅菌していない区において *Ct* による植物生長促進効果(共生効果)がより顕著に認められることから、*Ct* 株と土壌・根圏微生物叢が協調的に相互作用することにより、共生効果が促進あるいは安定化される可能性を発見した。ついで、共生効果を発揮している時の根圏細菌叢から単離した 10 種類の細菌群および 1 種類の酵母を混合した人工微生物集団を接種すると、土中のリンが欠乏した条件においては植物生長を著しく阻害したの

に対して、窒素欠乏条件では植物生長に寄与することを示した。これらの結果は、*Ct* 株が特定のタイプの細菌を根圏に誘引する可能性を示すものであり、微生物が集団として植物と相互作用することによって示す具体的な機能の発見として、新規性のある重要な成果である。

さらに、日本産の *Ct* 株コレクションの中から、シロイヌナズナに対して共生と寄生の対照的な感染効果を示す *Ct* 株について全ゲノム情報を新たに取得して比較ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、寄生型 *Ct* 株は感染初期に毒素合成およびアブシシン酸 (ABA) 合成に関わる遺伝子群の発現を活性化しており、植物ホルモンであるアブシシン酸および関連二次代謝物が寄生株の病原性発揮の原因となっていることを見出した。一方、共生型 *Ct* 株は感染後期に植物の高親和性リン酸トランスポーターを皮層細胞内の *Ct* 菌糸の周りに集積すること、および、*Ct* 株が誘導する植物地上部のリン蓄積が、植物生長促進効果の発揮に必要なことがわかった。これらの成果は、土壌・根圏微生物と植物間の協調的相互関係と競合的相互関係を区別する分子機構の解明に向けた大きな一歩と高く評価する。

本研究は、フィールド実験において見出した予期せぬ結果について、その機構を地道に追求することによって新たな研究分野の開拓に至ったものであり、努力と成果を高く評価する。今後も独自性の高い研究目標に向けて着実な研究を続けていきたい。

8. 藤井 壮太 研究者「遺伝育種の拡張に向けた種間隔離メカニズムの解明」

遺伝育種において種間交雑は新たな形質を導入するための重要な手順であるが、異なる種の間受精を妨げる種間障壁を打破しなくてはならない。種間障壁は多次元の生理機構が関与する複雑な現象であるが、藤井研究者は、様々なスクリーニング法を駆使して、シロイヌナズナと近縁のアブラナ科植物の間に見られる種間障壁因子、および同種認識シグナル因子の同定に成功した。まず、全ゲノム SNP 情報が利用できる約 300 のシロイヌナズナ系統を用いてシロイヌナズナの雌蕊に近縁アブラナ科のサンドストックの花粉をかけ、雌蕊内に花粉管の侵入を許す系統を探索した。GWAS によって選択したいいくつかの候補遺伝子座についてノックアウト株の形質を確認し、*SPR11* (*Stigmatic Privacy 1*) 遺伝子を見出した。通常のシロイヌナズナ野生系統は他のアブラナ科種の花粉を受け付けないが、*SPR1* 遺伝子が活性を失ったシロイヌナズナ変異体では、他種植物の花粉が侵入しやすくなっていることが明らかとなった。*SPR11* は、種間障壁の第一の関門である異種の花粉排除に広く関わる遺伝子として初めて単離されたものである。一方、植物種の半数以上は、同じ個体の花粉とは受精せず、同種別個体の花粉と受精して子孫を残す自家不和合性という性質を持っているが、*SPR11* タンパク質は自家不和合性を引き起こす分子メカニズムとは完全に独立した働きを持つことがわかった。さらに、*SPR11* タンパク質の機能を破壊した系統に、自種の花粉を受粉させるより前に異種の花粉を受粉させておくと著しく受精効率が下がった。*SPR11* タンパク質は異種の花粉が混在する野外環境下での種間のせめぎあいにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。

同種の花粉が雌蕊先端に接着すると、雌蕊細胞から水分の供給を受けて発芽するが、異種花粉の中には供給されない場合がある。藤井研究者は、雌蕊からの水分供給を引き起こす花粉成分を「同種シグナル因子」と位置づけ、その単離同定を目指した。まず花粉の表層成分を感知して雌蕊が発光するレポーターシステム (PCCF アッセイ) を開発し、変異源処理したシロイヌナズナの花粉をレポーターラインに受粉し、プレートリーダーを用いてシグナル活性を欠損した変異体のスクリーニングを行なった。変異体 7 系統を見出し、並列シーケンサーを用いて原因遺伝子を同定したところ、そのうち 4 つの系統で同一の遺伝子に変異が見出され、これが原因遺伝子の一つであることがわかった。

これらの成果は、地道な研究の積み重ねによって種間障壁の分子機構の解明に新たな展望を切り開いたもので、独自性の高い研究である。優れた基礎研究であり、今後様々な植物種の遺伝育種に幅広く利用される基盤となるものと期待する。今後は国際的な競争が激しくなると思われるが、先行者の強みを生かして研究をリードして欲しい。

9. 山本 英司 研究者「遺伝子情報に基づく表現型予測モデルの構築とコンピューターシミュレーション育種への応用」

収量・品質・栽培地での環境適応などの要素を満たす作物の品種改良の手法として、近年はゲノム情報に基づく表現型予測モデル (GS モデル) とコンピューターシミュレーションを利用した育種計画設計が行われているが、連鎖崩壊に伴う予測精度の低下や遺伝子座の多面発現性に対する曖昧さなどの問題が指摘されている。山本研究者は、全ゲノム配列解読によって遺伝子アリルを検出し、それに基づいた選抜マーカー群を説明変数とした GS モデルを構築することによって多数形質を同時改良する効率的な育種計画の設計を、具

体例として、日本の F1 大玉トマト品種 (*Solanum lycopersicum*、96 品種) の交配による果実糖度などの農業関連形質の向上を目指した。トマト参照配列へのマッピングおよびバリエーションコールによって 1,714,257 ヶ所の変異サイトを検出し、GWAS 解析によって、多数の有意シグナルを検出した。検出されたシグナルの中で既報の遺伝子に該当するものはなく、統計値と変異情報のみを用いた原因遺伝子の特定は困難であったが、GS モデルのためのマーカー選抜を行い、その表現型予測精度の検証を行ったところ、ほぼすべてのケースで、選抜マーカーに基づくモデルが全ゲノムに基づくモデルの予測精度を上回る結果を得た。この結果は、全ゲノム配列に基づく GWAS が診断バイアスに由来する偽陰性を回避することで適切なマーカー選抜を可能とし、これによって GS 予測精度を向上させ得ることを示している。また、本研究で選抜されたマーカーに基づく GS モデルの予測精度は、従来のランダムに選ばれたゲノムワイドマーカーを用いた GS モデルと比較して、交雑の進んだ世代でも高い予測精度を維持していた。さらに山本研究者は、トマト個体ごとの日射量、気温、湿度、地温、土壌水分の環境条件を測定する環境センシングシステムを開発し、局所的な環境バイアスが表現型値に与える影響を推定するとともに GS モデルへの反映を試みた。環境が比較的安定していると期待される養液栽培ハウスにおいても、特に土壌水分レベルにおいて大きな違いがあり、これらの環境情報を GS モデルの説明変数に加えることで、表現型予測精度を向上させられることを示した。これらの成果は、本研究で用いた手法が複数世代の連続交雑を想定した育種設計に適用可能であることを示したもので、表現型予測モデルの弱点を克服する手法の提案として新規性と独創性の高い研究と評価する。

本研究は、ゲノム育種の今後の農業展開に新たな具体的な方向性を提示したものである。まだ予備的な段階ではあるが、今後は民間種苗会社などと連携しながら、より複雑な形質に対するゲノム育種が実用化されるよう研究の進展を期待する。

10. 評価者

研究総括 岡田 清孝 龍谷大学龍谷エクステンションセンター フェロー

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は 2020 年 3 月末現在)

磯部 祥子 (公財)かずさDNA研究所先端研究開発部 室長
 内田 誠一 九州大学大学院システム情報科学研究院 教授
 角谷 徹仁 東京大学大学院理学系研究科 教授/情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 教授
 工藤 洋 京大大学生態学研究センター 教授
 白須 賢 理化学研究所環境資源科学研究センター グループディレクター
 田中 和幸*1 タキイ種苗(株)研究農場応用研究グループ チーフ
 土岐 精一*2 農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門 ユニット長
 鳥居 啓子 テキサス大学オースティン校 教授/ハワードヒューズ医学研究所 インベスティゲーター
 福岡 浩之*3 タキイ種苗(株)研究農場 副農場長
 福田 裕穂 東京大学 理事・副学長
 矢野 健太郎 明治大学農学部 教授
 矢野 昌裕 農業・食品産業技術総合研究機構本部 総括調整役

*1 2019 年 3 月まで

*2 2016 年 6 月から参画

*3 2019 年 4 月から参画

(参考)

件数はいずれも、2020 年 3 月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	31	31
口頭	145	44	189
その他	18	13	31
合計	163	88	251

(2)特許出願件数

国内	国際	計
1	0	1

(3)受賞等

- ・泉 正範
 - 2019年 4月 文部科学大臣表彰若手科学者賞
 - 2020年 9月 第38回日本土壌肥料学会奨励賞(2019年10月決定公表)
- ・高岡 洋輔
 - 2019年 9月 第13回バイオ関連化学シンポジウム 講演賞
 - 2019年 11月 植物調節学会 奨励賞
- ・田中 佑
 - 2017年 4月 日本作物学会第243回講演会 優秀発表賞
 - 2019年 3月 第23回日本作物学会研究奨励賞
- ・東樹 宏和
 - 2019年 3月 Human Frontier Science Program Awards 2019
- ・晝間 敬
 - 2019年 3月 日本植物病理学会学術奨励賞
 - 2019年 10月 第18回日本農学進歩賞

(4)招待講演

- 国際 47件
- 国内 27件

別紙

「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(2020年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
泉 正範 (兼任)	光合成老化の環境適合を可能にする分子デザインの創出 (理化学研究所環境資源科学研究センター)	理化学研究所環境資源科学研究センター 研究員 (東北大学学際科学フロンティア研究所 助教)	45
井上 晴彦 (兼任)	土壌細菌による鉄欠乏植物を救出するメカニズムの分子基盤解明 (農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門)	農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門 上級研究員 (農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門 主任研究員)	32
神谷 岳洋 (兼任)	フィールドでの非破壊元素動態モニタリング技術の確立と時空間動態解明 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 (同上)	42
高岡 洋輔 (兼任)	植物ホルモン活性のあいまい制御による環境応答バイオマーカー群の機能解明 (東北大学大学院理学研究科)	東北大学大学院理学研究科 講師 (同上)	40
田中 佑 (兼任)	非定常光環境におけるイネ光合成の遺伝的制御の包括的解明 (京都大学大学院農学研究科)	京都大学大学院農学研究科 助教 (同上)	41
東樹 宏和 (兼任)	頑健な植物共生システム的设计に向けた「コア共生微生物」探索技術の開発 (京大大学生態学研究センター)	京大大学生態学研究センター 准教授 (京都大学大学院人間・環境学研究科 助教)	46
晝間 敬 (兼任)	共生微生物群の機能解析とその活用による植物生長促進技術の開発 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)	奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 助教 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助教)	44
藤井 壮太 (兼任)	遺伝育種の拡張に向けた種間隔離メカニズムの解明 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	東京大学大学院農学生命科学研究科 助教 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助教)	41
山本 英司 (兼任)	遺伝子情報に基づく表現型予測モデルの構築とコンピューターシミュレーション育種への応用 (「公財」かずさDNA研究所先端研究開発部)	(公財)かずさDNA研究所先端研究開発部 研究員 (農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門 研究員)	41

研究報告書

「光合成老化の環境適合を可能にする分子デザインの創出」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016年10月～2020年3月

研究者： 泉 正範

1. 研究のねらい

光合成によるCO₂同化、その最終産物である炭水化物生産は、作物のバイオマス、収量、品質を直接規定する、作物生産における特に重要な反応である。しかしながら、数十日に及ぶ植物の葉の一生の間で、光合成の最大能力が発揮されるのは葉が若いうちの短期間であり、その後は葉緑体の光合成タンパク質(CO₂固定酵素 Rubisco など)が分解されることで減衰していく。この光合成活性の減衰現象を本研究では「光合成老化」と定義している。葉緑体の分解による光合成老化を人為的に遅らせることができれば、光合成の最大活性は変わらずとも正味の光合成産物を増やせる可能性がある。

ただし、「老化」という現象そのものは、不要となった器官の葉緑体タンパク質を分解し、その栄養成分を回収、再利用するための成長戦略の一つでもある。例えば、イネのような群落栽培では、相互遮蔽で光が届かなくなる下部の葉では葉緑体を積極的に分解し、栄養の回収、上位葉への転流・再利用を促進する必要がある。よって真に作物生産現場で有効となる老化改変は、「受光できる期間に合わせて光合成老化を10%遅らせることで光合成効率を最適化する」「日照が得られる段階は光合成老化を抑制するが、光が遮られるステージでは速やかに葉緑体を分解する」といった、フィールド環境、受光環境に合わせた光合成老化の最適推移を実現することである。本研究のねらいは、そのような微細かつ定量的な制御により、光合成老化を環境適合させるための基盤技術を構築することである。

2. 研究成果

(1) 概要

葉緑体分解に関わる基本的な仕組みを理解し、その関連遺伝子群を網羅的に同定するテーマA、同定した遺伝子機能をイネで改変し光合成老化の変化を実調査するテーマB、遺伝情報の改変を経ずに光合成老化を改変する手法として、化合物スクリーニングを行ったテーマC、そしてこれらの成果をフィールドに発展させる上で必要な情報を得るため、水田で起こるイネの老化現象を特徴づけたテーマDを行った。

本研究の開始時点で、細胞内自己分解システム「オートファジー」が葉緑体分解に関わることを見出していた。先に発見していた葉緑体を部分的に分解するオートファジー(RCB経路)に加え、葉緑体を丸ごと分解するオートファジー(クロロファジー)の2経路が存在することを同定し、両者が異なる仕組みで作動している証拠も得たため、それぞれの経路に特異的に関わる遺伝子群を網羅的に探索した。そして主に遺伝学的手法により、2つの葉緑体オートファジーそれぞれに関わる複数の候補遺伝子を同定した。また、オートファジー非依存的に葉緑体分解に関与する遺伝子も同定した。それらをまとめて「光合成老化関連遺伝子」と定義した。

この成果をイネに発展させた。RCB 経路に必要なオートファジー関連遺伝子をゲノム編集したイネ、オートファジー非依存的に葉緑体分解に関わるサリチル酸シグナルの鍵遺伝子を発現抑制したイネの2種を温室で栽培し光合成老化の実験を行った結果、最上位の葉（止め葉）の老化が遅れ光合成活性が高く推移することを確認した。よって、本研究で広く整備した光合成老化関連遺伝子の情報は、作物の光合成老化の制御を実践するうえで有用な基盤情報となることが示された。

また水田で栽培したイネの老化を多角的に調査し、フィールドで起きる老化現象を評価する基盤情報を得た。特に、止め葉と下位葉では、老化の進行様式が異なること、止め葉は光が当たり続ける中で老化が進行するため、その老化抑制は光合成産物の増加に直接結びつく可能性が高いことが見出された。上述したように、実験温室のデータではあるが、遺伝情報の改変により止め葉の光合成老化を遅らせることに成功しているため、本研究が目指す技術は実際にフィールドでも効果を発揮するものとなることを期待できる。そして本研究では、葉緑体のオートファジーを抑制する化合物をスクリーニングから得ることに成功したため、遺伝情報を改変せずに光合成老化を制御する手法への足掛かりまで得たと言える。

(2) 詳細

研究テーマ A 「光合成老化関連遺伝子群の同定」

先だって、細胞内自己分解システム「オートファジー」が葉緑体分解に関わることを見出していたが、先に発見していた葉緑体を部分的に分解するオートファジー（RCB 経路）が、新生二重膜小胞であるオートファゴソームとして、葉緑体の一部をくぶり切って液胞に運ぶマクロオートファジーと呼ばれる経路であり、主にアミノ酸の再利用を促進することを確認した（Hirota, Izumi et al., 2018）。一方、本経路に加えて、葉緑体を丸ごと分解するクロロファジーが、上記部分分解とは異なるタイミングで起こることを発見した（Izumi et al., 2017）。このクロロファジーは、液胞膜が分解物を直接隔離するマイクロオートファジーと呼ばれる経路であることを確認した（Nakamura et al., 2018）。

以上の成果から、2 種の葉緑体オートファジーが異なる仕組みで作動していることが確認されたため、それぞれの経路に特異的に関わる遺伝子群の情報を、逆遺伝学、順遺伝学により整備した。具体的には、部分分解に関わる遺伝子候補 3 種、全分解に関わる遺伝子候補 8 種の情報を得た。

また、オートファジー非依存的に葉緑体分解に関わる遺伝子を同定するため、老化時の葉緑体タンパク質分解が遅れる変異株を解析し、その原因遺伝子 4 種の情報を得た。これらの遺伝子群を、光合成老化を制御する上で着目する遺伝子として、光合成老化関連遺伝子群とした。本研究テーマでは、葉緑体分解に関わる多数の遺伝子を、光合成老化を制御するための基盤情報として整備することが目的であったため、その目的は概ね達成できたと言える。

研究テーマ B 「光合成老化関連変異株の定量評価」

テーマ A の成果をもとに実際に光合成老化を改変するため、まずいくつかの遺伝子についてシロイヌナズナ変異株を用いて実試験を行った。部分分解に必要なオートファジー関

連遺伝子及びオートファジー非依存的に光合成老化に関わる植物ホルモン・サリチル酸関連遺伝子の 2 系統の変異株で、光合成老化が抑制され光合成活性が高く推移することを確認した。

そこで、当該オートファジー関連遺伝子のイネオーソログのゲノム編集イネ及びサリチル酸シグナル因子を発現抑制したイネを、実験温室で栽培し、最上位葉(止め葉)の光合成老化を実測した。その結果、両系統とも、光合成老化が一定程度抑制され、光合成活性が高く推移する傾向が見られた。よって、テーマ A で整備した遺伝子情報を基に作物イネの遺伝情報を改変することで、実際に光合成老化を変動させることが可能であることが示された。

研究テーマ C 「光合成老化に作用する化合物スクリーニング」

葉緑体オートファジーの細胞内現象を指標に、その抑制化合物をライブラリーから単離する試みを行った。実際に、部分分解だけを抑制する化合物、全分解だけを抑制する化合物を、複数単離することに成功した。これらは、ゲノム情報を改変せず光合成老化を制御するアプローチの足掛かりになることが期待される。

研究テーマ D 「フィールドで起こる老化現象の実体評価」

宮城県大崎市鹿島台の実験用水田で栽培したイネ(品種ササニシキ)を用いて、栄養成長期から登熟期(7 月から 10 月)の期間における葉の老化過程を評価する解析を 3 年間(2017-2019)にわたり行った。光合成活性と老化関連パラメータの時間推移と、RNA-seq により転写産物の網羅的な情報を得た。

まず、登熟期に最も光合成産物を同化するとされている止め葉に着目すると、光が当たり続けていても 8 月後半から葉緑体成分の分解に伴って光合成活性が低下することが確認された。テーマ B で、遺伝情報の操作により止め葉の老化を遅らせることができることが示されており、この成果は、実際に生産現場で光合成産物を増加させる技術になる可能性を示している。関連して、テーマ A、B で具体的に着目した細胞内現象であるオートファジー関連遺伝子群が、水田イネの老化に伴い発現上昇することも確認でき、本研究の着眼点がフィールドの現象制御につながるものであることも示された。

一方、上位葉から下部の葉の老化現象を比較したところ、止め葉では葉緑体タンパク質の分解と緑色色素(クロロフィル)の減少が同時に起こるのに対し、下位の葉では、葉緑体タンパク質の分解が緑色の減衰に先んじて起こることが見出された。これは同じイネの葉でも部位によって異なる老化現象が起きていることを示唆している。今後その実体に迫ることができれば、イネの老化をより微細に制御するための方策を打ち出すことにつながると期待できる。

3. 今後の展開

本研究では、実験温室での解析で、光合成老化が遅れ光合成能力が高く推移するイネを作出することに成功した。今後その再現性を慎重に評価すると共に、ゲノム編集イネを中心にフィールド環境での試験に発展させていくことで、作物栽培現場における有効性を評価する。水田でも光合成が効率化され、収量や品質にプラスの効果が得られれば、本研究がデザインした作物およびデザインの戦略が社会実装に近づくことと期待される。すでに光合成老化関連遺

伝子を多数同定しており、遺伝子操作によって光合成に対するプラス効果が期待される遺伝子を優先にゲノム編集イネを順次作出していくことで、より有用な系統を作出することにも取り組む。

また水田イネで得た遺伝子発現量の時間変化に関する網羅的データをより深く掘り下げていくことで、光合成老化を改変するための新たな遺伝子ターゲットが浮かび上がってくることも期待される。葉緑体オートファジーの抑制化合物候補のターゲットを具体的に明らかにすることで、より高活性な化合物を開発し、遺伝情報を改変せず化合物の施与により老化を制御する戦略も想定できる。このように、本研究のデザイン技術を、多数の遺伝子や異なるアプローチを駆使して作物を改良しようとするより高度な研究領域に発展させていく。

4. 自己評価

作物生産における葉緑体分解の重要性は古くから着目されていたが、その経路の実体は長らく未解明であった。我々は本研究に先立ちその実態に迫る成果を得て、本研究の遂行により、オートファジーによる葉緑体分解経路の全容を示すに至った。

そして本さがけ研究の主たるねらいは、基礎研究の域にあった葉緑体分解機構の研究を、「光合成の効率化」という、実際に農業生産に役立つ技術にまで発展し得るかを実評価することでもあった。結果として、モデル植物で得た成果をベースに作物イネの光合成を改変するに至ったことから、本研究の一つの目的は達成されたと言える。この主目的の成果と言える部分については学術論文としてのデータ公表に至っていないため、今後早急にデータを集めて公表につなげる必要がある。

今後、本研究で得た成果を社会実装させていくためには、イネの老化制御の収量・品質への影響や、フィールド環境での有効性を検証していく必要がある。その検証を進める上では、本研究テーマDで集めたフィールド試験のデータを一つの指標とすることができるが、大規模データ解析に関する技術不足と時間的な制約から、データの深い考察や最終年度のサンプル解析が突き詰められていない現状があり、この点は研究期間早期に適切な共同研究者を見つけるなどして解決する必要があった。現在は、CREST植物頑健性領域、及び同じさがけ領域の研究者と、互いの研究プロジェクトの成果形成に役立つ形でのデータ解析を共同で進めている。また、本研究では作物としてイネを用いたが、異なる作物でも老化制御の有効性を検証することで、より高い波及効果につながると考えている。

本研究の推進に当たる一つの特筆すべき点は、当初は計画していなかった研究計画が、本さがけ研究を通じて得られた人脈により次々と生まれた点である。光合成老化を抑制する化合物のスクリーニング、ゲノム編集技術の提供、サリチル酸シグナル抑制イネの解析、水田イネのオミクス解析、などは、本研究の成果の中核をなす解析ではあるが、全てさがけ開始後の共同研究(大部分がさがけ研究者との共同研究)として開始したものである。多くの先駆的な若手研究者と切磋琢磨できるさがけ研究に身を置き、その環境を活用することで新しい解析に次々と挑戦できたことは、極めて重要な経験となったと自己評価している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Izumi M*, Ishida H, Nakamura S, Hidema J (2017) Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *The Plant Cell* 29: 377–394, *Corresponding
2. Hirota T¹, Izumi M¹, Wada S, Makino A, Ishida H (2018) Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 59: 1363–1376, ¹Co-first
3. Nakamura S, Hidema J, Sakamoto W, Ishida H, Izumi M* (2018) Selective elimination of membrane-damaged chloroplasts via microautophagy, *Plant Physiology* 177: 1007–1026, *Corresponding

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 「植物の新たなオートファジー経路ー壊れた葉緑体を取り除くオートファジー経路「クロロファジー」の発見ー」、2017年1月30日、プレスリリース
2. 「環境に応じた葉緑体分解を担う2種のオートファジー経路」
日本農芸化学会 2018年度大会、名古屋・名城大学、2018年3月16–18日、招待講演
3. “How chlorophagy is executed: Induction and intracellular events”
Gordon Research Conference on Mitochondria & Chloroplasts, イタリア, 2018年7月8–13日、招待講演
4. 「故障した葉緑体を取り除く植物オートファジーの駆動プロセスを解明」
2018年5月31日、プレスリリース
5. 「体内窒素利用と光合成活性のバランスは改変し得るか？」
日本光合成学会、仙台・東北大学、2018年5月26–27日、招待講演

研究報告書

「土壌細菌による鉄欠乏植物を救出するメカニズムの分子基盤解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 井上 晴彦

1. 研究のねらい

鉄は土壌中に豊富に存在するが、中性からアルカリ性の条件下で沈殿しやすく、植物は鉄吸収できないので、収量低下などの農業上の問題になっている。土壌中には植物の病原体が存在する一方、有益な微生物が存在することが知られている。特に、植物の生育を促進する細菌は Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) と呼ばれ、有用な生物農業資材として注目されている。

そこで、病原性細菌は宿主に感染するために進化を遂げる一方、PGPB は極限環境下では宿主を救出するための進化を遂げるのではないかと仮説を立てた。これを検証するために研究経験のある極限環境に鉄欠乏を選び、この研究の礎となるアルカリ土壌を探した。イタリアの Adamo D. Ramobora 教授の実験農場では、低生産性のアルカリ土壌において、有機農法を利用して驚くべき高収量のブドウの生産に成功していた。このような土壌に鉄欠乏条件下で植物の生育を促進するような有用細菌が存在すると考えた。

まず、この土壌を用いてシロイヌナズナを栽培し、根に寄生する約 1,000 の細菌を限界希釈培養法により単離した。これと並行して、高 pH では不溶性となる鉄の性質を利用した新規の植物鉄欠乏アッセイ系を開発した。この鉄欠乏 MS 培地に上述の単離細菌を各々混合し、植物を鉄欠乏から回復させる細菌のスクリーニングを行った結果、60 の細菌がその能力を持つことを突き止めた。この内のバクテリア#237(PGPB237)は、*Shingobacterium* に属する新規の細菌で、特に高い鉄欠乏回復活性を持っていた。

PGPB237 による鉄欠乏回復機構を詳細に解析するために、鉄移行に関わるシロイヌナズナの種々の遺伝子欠損株を用いて、PGPB237 による鉄欠乏回復実験を行ったところ、鉄のトランスポーターである *Yellow stripe1-like (ysl1)* の変異株において、この回復効果が喪失することを見いだした。AtYSL1 は、トウモロコシの根からの鉄吸収に必須である YS1 と最も相同性が高く、葉と根で発現して鉄・ニコチアナミン錯体の輸送することが報告されている。一方、ニコチアナミンは根圏に分泌されないことから、AtYSL1 は根の表皮において、未知のキレート鉄錯体を取り込むことが強く示唆された。

本研究では、上記の仮説を植物および微生物の遺伝学と分子生物学的手法を用いて検証し、PGPB による植物の鉄欠乏回復の分子機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、土壌細菌による鉄欠乏植物を救出するメカニズムを明らかにすることに取り組んだ。この現象を、分子レベルで明らかにするために、シロイヌナズナの鉄代謝に関わる変異体を使った遺伝学的及び生化学・分子生物学的アプローチを採用した。本研究により、

植物の鉄欠乏を感知して、有用バクテリアが植物に鉄を供給するために、植物が吸収可能なシデロフォアを供給することが明らかになった。さらに、単子葉植物のイネにおいても、有用バクテリアを用いた救出機能は保存されており、植物種を超えた一般性を持つことが示唆された。

(i) 鉄欠乏救出 PGPB の分子基盤解明

本研究によって、バクテリア群は植物を鉄欠乏救出する方法を、数種持つことが明らかになった。本研究開始当初、鉄欠乏時にシロイヌナズナの根から浸出するクマリンに着目して研究を行った。研究の結果、クマリン生合成経路の代謝物を加えることで、植物を鉄欠乏から回復することが明らかになった。これに加えてバクテリアが放出するキレート物質が関与することを明らかにした。このキレート物質はバクテリア特異的物質であり、鉄欠乏植物存在下のみで放出される。土壌中で鉄とキレートして錯体を形成し、植物の特異的トランスポーターである AtYSL1 によって吸収されることが分かった。さらに、AtYSL1 は鉄欠乏状態の植物において、バクテリア存在下でのみ強く誘導される。

(ii) 鉄欠乏救出 PGPB の宿主植物普遍性の検証

鉄欠乏シロイヌナズナは、有用バクテリアにより救出されることが明らかになっている。そこで、この現象の植物種普遍性が存在するかを検証するために、この PGPB を用いて、鉄欠乏イネを救出できるか否かを調査した。実験条件を最適化すると、草丈、クロロフィル含量共に優位に違いが見られ、有用バクテリアを含む培地でイネの生育が改善された。このことから、有用バクテリアは、双子葉植物だけではなく単子葉植物のイネも鉄欠乏条件下での生育を改善させ、植物種に依存しない一般性を有する鉄欠乏救出活性を持つことが明らかになった。

(2) 詳細

研究テーマ A「鉄欠乏救出 PGPB の分子基盤解明」

本研究によって、バクテリア群は植物を鉄欠乏から救出する方法を数種持つことが、様々な有用バクテリアを異なる鉄輸送変異株を用いてアッセイすることで明らかになってきた。本研究開始当初、鉄欠乏時にシロイヌナズナの根から浸出するクマリンに着目して研究を行った。研究の結果、クマリンの生合成経路の下流の化合物であるフラクセチンを加えることで、植物を鉄欠乏から回復させ得ることが明らかになった。

これに加えてバクテリアが放出するキレート物質であるピロロキノリンキノン(PQQ)が関与することが明らかになった。PQQ は 1979 年に NAD、FAD に次いで、3 番目の補酵素として、微生物から発見された。その後、各種微生物の代謝においてメタノール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素などの酸化還元反応に重要な役割を果たしていることが次々に明らかとなった。この PQQ はバクテリア特異的物質であり、このキレート物質

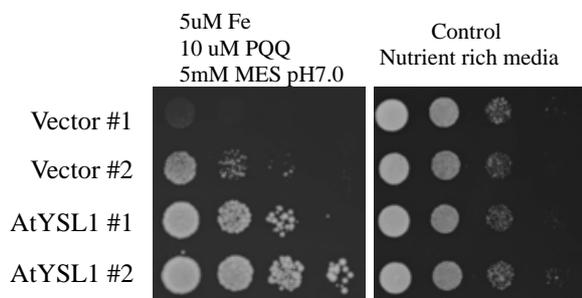


図1 AtYSL1はFe-PQQ錯体を輸送する

は鉄欠乏植物存在下のみで放出されるされることが MS 解析によって明らかになった。これによって、鉄欠乏条件で鉄とキレートして錯体を形成して可溶化する。この錯体を用いて、野生型と *ysl1* 変異株で鉄欠乏救出アッセイを行うと、野生型は救出されるが変異型は回復しなかった。さらに、Fe-PQQ 錯体を用いて、シロイヌナズナの特異的トランスポーターである AtYSL1 の吸収アッセイを、酵母とアフリカツメガエルの卵母細胞を用いて行ったところ、AtYSL1 が輸送タンパク質で有ることが明らかになった。加えて、AtYSL1 は鉄欠乏状態の植物において、バクテリア存在下でのみ遺伝子発現が強く誘導された。

これらのことは、植物がバクテリアに反応してトランスポーター遺伝子の発現を誘導し、他方バクテリアが植物に呼応して PQQ の産生・分泌を促すという、協調的な相互作用を行っていることを意味する。換言すると、鉄欠乏条件下における鉄のやり取りによって、植物は自身の生育を、有用バクテリアは植物の根に広く多く寄生できるという、互惠関係を結んでいると考えられる。1980 年代初頭に盛んに研究された結果に基づき、バクテリアを介した植物の鉄獲得機構である Strategy-III が提唱されている。本研究によって鉄欠乏時のバクテリアが放出するキレート物質と、植物のトランスポーター遺伝子の単離は上記の仮説を裏付ける結果となった。

一方、PGPB237 に変異を導入して、鉄欠乏植物を救出できない変異バクテリア株を単離する実験については、大きな前進が見られなかったのは残念である。大規模スクリーンによる鉄欠乏アッセイが、技術的理由により実施できなかったのが大きな要因の一つである。しかし、今後の研究の展開として、機能変異を起こしたバクテリアを研究に供試することは、極めて重要であると考えている。

一方、PGPB237 に変異を導入して、鉄欠乏植物を救出できない変異バクテリア株を単離する実験については、大きな前進が見られなかったのは残念である。大規模スクリーンによる鉄欠乏アッセイが、技術的理由により実施できなかったのが大きな要因の一つである。しかし、今後の研究の展開として、機能変異を起こしたバクテリアを研究に供試することは、極めて重要であると考えている。

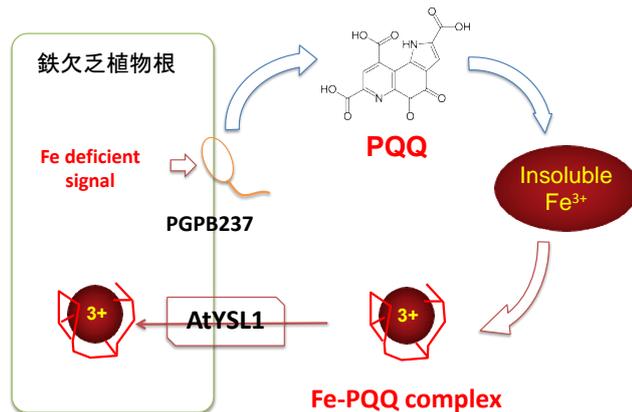


図2 AtYSL1を介した有用バクテリアによる植物の鉄欠乏救出機構

研究テーマ B「鉄欠乏救出 PGPB の宿主植物普遍性の検証」

鉄欠乏シロイヌナズナは、有用バクテリアにより救出されることが明らかになった。そこで、この現象の植物種普遍性が存在するかを検証するために、この PGPB が鉄欠乏イネを救出できるか否かを調査した。実験条件を工夫すると、有用バクテリアを含む培地でイネの生育が改善され、草丈、クロロフィル含量共に優位な違いが見られた。このことから、有用バクテリアは双子葉植物だけではなく、単子葉植物のイネでも鉄欠乏下での生育を回復させ、植物種に依存せず普遍的な鉄欠乏救出活性を持つことが明らかになった。

このような鉄欠乏を救出する有用バクテリアは、世界のアルカリ土壌の分布を見ても海外で使用し得る潜在性を持つ。本研究で用いてきたバクテリアは、イタリア原産なので法律的な規制が多く使用しにくいいため、日本独自の菌株を取ることにした。日本は基本的に酸性土壌であるがアルカリ土壌も点在する。珊瑚を起源とする石灰質アルカリ土壌は、内陸の石灰鉱山または日本の南方の諸島に存在する。日本全国のアルカリ土壌である 5 地点で採取し

た土壌と、対象区として茨城県つくば市で採取した土壌でイネを生育した。その結果、草丈は宮古島>小笠原>土別>美祢>高岡の順であった。土壌、根圏、根における微生物叢を解析した結果を基に、3DPCoA を描かせてみると、根、根圏、土壌と分離した(図 3)。また、土壌の微生物叢の多様性を調べると、高岡の土壌で最も高いことが分かった。高岡でサンプリングした土壌は、農業用の肥料としても定評があることから、微生物叢が豊富であることと何らかの関係がある可能性がある。

並行して、日本の土壌からバクテリアライブラリーの作製を行った。用いた土壌はアルカリ土壌にも関わらず、最も生育の良かった宮古島の土壌を用いた。この土壌より限界希釈法を用いて約 300 のバクテリアを単離した。これを、イネを用いて温室で鉄欠乏アッセイを行ったところ、300 のバクテリアのうち約 60 個を接種した区において、草丈平均値が何も接種していないイネよりも高い結果となった。今後、これらの菌株の同定、またはイネを用いたバクテリアを介した鉄獲得機構を理解し、将来的には微生物資材または鉄資材としての実用化を視野に入れた研究へと発展させていきたいと考えている。

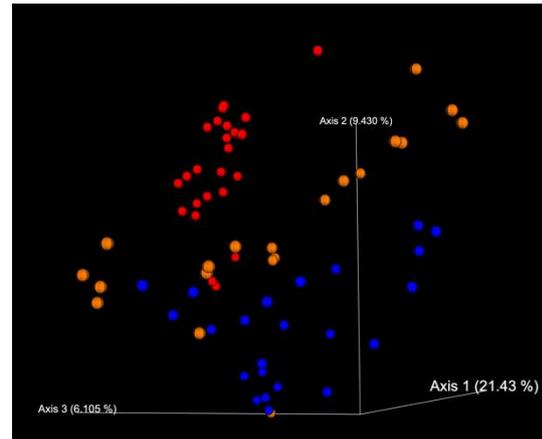


図 3 日本のアルカリ土壌における微生物叢

3. 今後の展開

本さがけ研究を通じて、土壌微生物が植物を鉄欠乏から救出する分子メカニズムの一端が明らかになった。その機構は、植物の鉄欠乏を感知すると、有用バクテリアが放出するキレート物質である PQQ が鉄と錯体を形成し可溶化して、植物の AtYSL1 を介して植物に吸収されるというメカニズムであった。しかし、この他にも土壌微生物を介した植物への吸収機構は数種有ると推定され、今後他の救出機構についても解析を行っていきたい。

世界的に見るとアルカリ土壌が広がる大地があり、農業生産が著しく低い地域がある。私は農業研究機関に所属することから、これらの土壌を抱える人々の農業に寄り添うことも使命であると考えている。将来、有用なバクテリアだけでなく、Fe-PQQ またはより強力なキレート鉄を新たに発見し、不毛な大地を緑化していく研究に邁進する所存である。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究課題では、有用バクテリアによる植物の鉄欠乏救出のメカニズムの解明に取り組んだ。さらに、植物種としてシロイヌナズナに加え、単子葉植物であるイネも用いて、研究を進展させた。その結果、植物の救出に必要なトランスポーター遺伝子を明らかにし、バクテリアが放出するキレート物質を単離した。また、イネにおいてもバクテリアによる効果は保存されていた。さらに、植物変異株を用いた実験により、有用バクテリアによる植物の鉄欠乏救出機構は、少なくとも数種類存在することが明らかになった。当初本研究の目的としていた、鉄欠乏救出機構

の包括的な理解をするという点において、一定の達成は得られたと考えている。しかし、バクテリアのキレートを探索する段階で多分に時間を取られ、研究終了までに成果の報告ができなかったことが非常に悔やまれる。今後、必要十分な実験結果を積み上げてから研究成果として報告したい。

【研究実施体制及び研究費執行状況】

本研究実施に当たっては、さきがけ研究者の井上と研究補助者 3 名が参画した。研究補助者の 1 人は経験者であったが、残り 2 人は未経験者を採用した。農研機構で研究補助員として勤務した経験があったものは、即戦力として研究所の実験機材・温室を駆使して本研究に大きく貢献した。未経験者は、文系の大学卒であったが研究手法の飲み込みが早かった。また、さきがけメンバー・アドバイザー・統括・領域担当は研究に対して前向きで、非常に助けていただいた。実験の技術的などころから始まり、材料の提供・情報の交換・さらに共同研究などさまざまな局面でサポートしていただいた。

本研究では、多くの栽培スペースが必要となり、かつ数をこなす実験が必要であった。さきがけ研究費を用いて、これまで研究所に眠っていた人工気象器を、検査と修理することで再利用して植物を栽培する場所を確保した。また、実験には多くの手数が必要となるが、研究補助員 3 名を当てて実験を行った。ここまでの研究成果は、さきがけ研究で構築した研究体制と設備がなければ実現しなかったものと考えている。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

得られた成果はまだ未熟であり、今後、改良も含めた検討も多々必要と考えられる。しかし、さきがけ研究開始時より研究者間での共同研究や、特に企業との共同研究が始まり本研究への期待が高まっているように感じられる。今後も、様々な研究者や企業と共に連携し、応用研究への展開を進めていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. H. INOUE, M. Hashimoto, Y. Bai, A. D. Rombolà, P. Schulze-Lefert. Plant growth promoting under iron-deficiency mediated by the Arabidopsis thaliana bacterial root microbiota. MPMI, July 14-18, 2019, Glasgow, Scotland.

研究報告書

「フィールドでの非破壊元素動態モニタリング技術の確立と時空間動態解明」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016年10月～2020年3月

研究者： 神谷 岳洋

1. 研究のねらい

植物が育つには無機必須元素が必要であり、無機必須元素の主な供給源は土壌である。植物の栽培に適した養分に富んだ土壌は少なく、我々人類は多くの場合には施肥により栄養分を補填し、収量を保っている。一方で、施肥には多くのコストがかかること、過剰投与による環境汚染を招くなどといった問題がある。これらの問題を解決するには、土壌中の栄養を効率的に吸収・利用できる作物の育種、栽培法の確立による、必要最小限の肥料による効率的な作物栽培が必要である。そのためには、実際の栽培環境における植物の元素輸送システム、すなわち、植物の元素動態とそれに関与する環境的要因・遺伝的要因ならびにそれらの相互関係を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、フィールドで利用可能な無機必須元素の非破壊モニタリング技術の確立ならびに圃場での時空間的な元素動態に関与する分子機構を解明することを目的とする。

具体的には、ハイパースペクトルカメラを用いた植物の元素動態の非破壊モニタリング技術の開発を行なう。ハイパースペクトルカメラにより得られたスペクトルデータとICP-MSにより得られた精度の高い元素濃度のデータから、元素濃度推定モデルを回帰分析によって作成し、時空間的に高解像度で元素動態を捉える。加えて、実際の作物の栽培環境での実証試験を行う。また、ハイパースペクトルカメラを用いて、実際の作物の栄養診断にも取り組む。並行して、イネやトマトなど実際の作物を用いて、圃場での元素動態に関与する遺伝子の同定を行う。

本研究の大きな目標は、元素動態を圃場において非破壊で観察するこれまでにない技術の創出である。この技術を確立することによって、変動する環境下での作物の栄養状態を時空間的に正確に把握し、これまでは可視化することができなかった植物の栄養状態を捉えることが可能になると考えている。本研究を通して、栄養状態の変化に頑健な栽培技術基盤の創出や、育種基盤の構築を行なうことを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、1)ハイパースペクトルカメラを用いて、植物の元素動態および栄養状態を可視化すること、2)元素動態を司る遺伝子の同定と解析を目的としている。

1)に関しては、トマトの葉および果実における元素推定モデルを Partial Least Squares (PLS) 回帰により作成し、カリウムやリンなど多量必須元素について精度良く推定できるモデルを作成した。栄養診断については、トマトの葉をサンプルとして用いた。窒素、リン、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄、をそれぞれ除いた水耕液で一ヶ月程度栽培した後、葉をハイパースペクトルカメラにより撮影し、PLSにより栽培条件を判別するモデル作成を

行った。窒素とリンを除いて、顕著な欠乏症状は認められない条件にもかかわらず、スペクトル情報をもちいた判別モデルでは、90%近い正解率が得られた。このことは、ハイパースペクトルカメラを用いた栄養診断が実現可能であることを示している。今後、多くの作物で実証するとともに、実際に圃場での栽培に向けた技術の改善が必要であり、継続して研究を進めていく予定である。

2)に関しては、イネにおける変異株の解析、トマトの GWAS、ハクサイの QTL 解析を行った。イネにおいては、コバルトとニッケル、亜鉛とカドミウムを輸送する輸送体の同定、モリブデンの輸送に関与する遺伝子は同定しつつある。モリブデン輸送体は新規の輸送体であり、機能解析を進めている。トマトおよびハクサイに関しては遺伝子座の同定まで行っており、今後遺伝子の同定を進めていく。なお、ハクサイについては企業との共同研究が進んでおり、DNA マーカーの開発を行っていく予定である。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ハイパースペクトルカメラによる植物の元素動態および栄養状態の可視化」

ハイパースペクトルカメラによる撮影のセッティングから行った。ハイパースペクトルカメラは以下の2台を用いた: 400-1100 nm(波長分解能 2 nm); 900-1600 nm(波長分解能 3.3 nm)。なお、光源はハロゲンランプを使用した。撮影するサンプルは、バーミキュライトで1ヶ月程度栽培したトマトの葉を用いた。小葉全体、もしくは、小葉を3-5分割した断片をハイパースペクトルカメラにより観察した。また、ハイパースペクトルカメラの画像から関心領域の波長情報を抽出するパイプラインを作成した。次に、ハイパースペクトルカメラで観察した同じサンプルを ICP-MS による元素分析を行い、以下の元素について信頼できる値を取得した: Li, B, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd。最終的には、8 回に分けて栽培したトマトより、計 933 サンプルのハイパースペクトルデータと ICP-MS による元素濃度の情報を得た。これらのサンプルを用いて、外れ値の除去や平滑化などの前処理を行った後、PLS による元素推定モデルの構築を行った。モデルの作成に全体の 75%のサンプルを用い、10 分割クロスバリデーションによりモデルを構築した。次に、モデルの作成に用いていない残りの 25%のサンプルの元素濃度を推定した。その結果、カルシウムで予測値と実測値(モデルの作成に用いていないサンプル)の決定係数が最も高く、 $R^2=0.74$ であった。

上記の回帰に加えて、トマトの栄養状態をハイパースペクトルカメラにより捉えることが可能か検討した。目的は、顕在化する(人の目に見える)前にハイパースペクトルカメラにより欠乏症状を捉えることである。栄養診断は、トマトの葉を用いて行った。通常条件、通常の 10 分の 1の窒素、または、リン、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄をそれぞれ除いた水耕液で栽培し、1 ヶ月後、第 3、4 葉をハイパースペクトルカメラにより撮影した。関心領域 (ROI)は葉をメッシュで区切った 1 区画としデータ数を増やした。ハイパースペクトルカメラにより得られた反射スペクトル強度を説明変数として、PLS により栽培条件を判別するモデルの構築を行った。モデルの作成に全体の 75%のサンプルを用い、10 分割クロスバリデーションによりモデルを構築した。次に、モデルの作成に用いていない残りの 25%のサンプルの判別を行った。次に、1枚の葉においてどの条件と判別された ROI が多いかを多数決を取り、1 枚の葉の判別を行った。その結果、88%の正解率で、どのような栄養条件で栽培されたかを判別するこ

とができた。

研究テーマB「元素動態を司る遺伝子の同定」

これまでに取得した地上部や玄米の元素濃度が異なるイネ変異株(EMS 変異導入株)を材料として遺伝子の同定を進めた。次世代シーケンサーを用いた遺伝子マッピングにより、新たに4つの変異株について、候補領域と候補遺伝子を同定した。1つ目は、玄米と地上部のCoとNiが高い変異株(1187_n)で、原因遺伝子はこれら元素の輸送体であるOsFPN1をコードしていた。ゴルジ体に局在すること、酵母を用いたCoとNiの輸送活性の測定、変異株の生理的解析から、CoやNiを根のゴルジ体に隔離することにより、これら元素に対して耐性を付与していることを明らかにした。2つ目は、玄米のMo濃度が高くなる変異株(1003_a)で、候補遺伝子は1番染色体の35 Mbにある機能未知の輸送体をコードしていた。硝酸濃度が高い条件で栽培すると生育が抑制されることから、窒素同化に必要なMoを輸送しているものと考えている。現在、CRISPR/Cas破壊株を作成しているところであり、今後も解析を続けて行く予定である。3つ目は玄米でCdとZnが低い変異株であり、その原因遺伝子は既知の遺伝子OsHMA2をコードしていた。4つ目は、カルシウムやナトリウムなど複数の元素濃度が異なる変異株であるが、この系統は遺伝子の逆位がおきており、複数の遺伝子が候補であることが示唆された。また、上記のイネ以外にトマトやハクサイの元素動態に関与する遺伝子座を同定した。

3. 今後の展開

本研究により、ハイパースペクトルカメラを用いた元素動態および栄養状態の可視化が可能であるということを示すことができた。今後は、野外でも可能な技術にすることが必須であると考えている。作物の栽培や栄養診断モデルの作成を実験室内でという制限がつく。つまり、実際とは異なる環境でのモデルは圃場ではうまく機能しないことが予想される。また、本研究ではトマトのみを対象としており、他の作物については個別にモデルを作成する必要がある。このことから、農業試験場や農家など、実際に栽培を行っている方と組んで研究を進めていくことが必要である。また、技術の社会実装という面では、民間企業との連携も必要であると考えている。

2つ目の元素動態に関わる遺伝子の同定に関して、イネにおいて、複数の変異株を単離し、原因遺伝子を同定している。本研究期間内に同定できた遺伝子はCo輸送に関わるものだけであったが、その他に人での欠乏症が問題となっている鉄や亜鉛を多く含む変異株や、人にとって毒性元素であるヒ素濃度が低い変異株も単離している。これらの原因遺伝子を同定し、これら元素濃度を变化させたイネの育種を行っていきたい。トマトおよびハクサイについては、遺伝子座を同定しており、今後は遺伝子の同定およびDNAマーカーの作成を行い、育種へとつながる技術の構築を行っていきたい。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

本研究課題では、(1)野外で使える元素動態モニタリング方法の開発と、(2)植物の元素動態に関する遺伝子の同定に取り組んだ。

(1)に関しては、ハイパースペクトルカメラを用いて、少なくとも実験室内では利用可能なシステムを構築し、元素濃度を推定できることを示すことができた。一方で、このシステムを野外に持ち出すことは技術的に既存の装置では難しかった。そこで、最終年度になってしまったが、野外に持ち出すことが可能な、光源を含む小型の分光センサーでの予測モデルの作成を進めた。窒素について検討を行ったところ、温室で栽培しその場でセンサーを用いて測定した場合に、センサーによる予測値とCNコードによる窒素の実測値の決定係数が0.57と比較的高い値が得られ、応用への一歩を踏み出すことができた。

(2)に関しては、期間内に複数の元素濃度が異なるイネ変異株の原因遺伝子を同定し、一定の成果は得られたものと考えている。一方で、トマトやハクサイに関しては遺伝子座の同定までは進んでいるものの、イネやシロイヌナズナと比較すると実験材料や実験技術が整っていないことから、遺伝子の同定には至らなかった。この点は見通しが甘く反省するとともに、今後の解析が必要である。

本研究は、私以外に、博士課程後期大学院2名(2名とも留学生)、実験補助者1名で進めた。学生は2名ともイネの変異株の解析を行い、うち1名は、イネのCoや複数の元素が異なる変異株を解析し、2019年9月に学位を取得した。研究のみならず教育にも貢献できたと考えている。

本研究の内容は、私にとってさきがけで取り組んだ新たなテーマであり、本研究費のおかげで、新たな領域に挑戦することができた。当初の目的を達成できていないところもあるが、研究内容を学会で発表することにより、研究内容に興味をもていただいた研究者や企業があり、今後、共同研究や新たな研究費を獲得し、基礎研究のみならず、応用研究を展開して社会実装につなげていきたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kan M, Yamazaki K, Fujiwara T, Kamiya T*. (2019) A simple and high-throughput method for xylem sap collection. *BioTechniques*, 67, 242-245, 2019.

*corresponding author.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Takehiro Kamiya, Nobuhiro Tanaka, Toru Fujiwara. Ionic screening of EMS-mutagenized rice. International Plant Nutrition Colloquium 2017, Copenhagen, Denmark
2. Manman Kan, Toru Fujiwara, Takehiro Kamiya. Golgi-localized OsFPN1 is required for cobalt and nickel homeostasis in rice 第60回日本植物生理学会年会、2019年、名古屋

屋大学

3. 神谷岳洋、反田直之、藤原徹 ハイパースペクトルカメラを用いた元素動態の可視化技術の確立 日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年、東北大学
4. 神谷岳洋、反田直之、藤原徹 ハイパースペクトルカメラを用いた植物の栄養診断 日本土壤肥料学会 2018 年度神奈川大会、2018 年、日本大学
5. 神谷岳洋 ハイパースペクトルカメラを用いた作物の栄養診断 日本土壤肥料学会 2019 年度静岡大会 シンポジウム(招待講演)、2019 年、静岡大学

研究報告書

「植物ホルモン活性のあいまい制御による環境応答バイオマーカ一群の機能解明」

研究タイプ：通常型

研究期間：2016年10月～2020年3月

研究者：高岡 洋輔

1. 研究のねらい

植物の分化、生長等を司る植物ホルモンには、そのシグナルを受容する植物ホルモン受容体サブタイプが「複数」存在し、多様なホルモンの活性をそれぞれのサブタイプが制御する。本研究では、この受容体サブタイプのいくつかと選択的に結合し活性化する分子を開発し、植物ホルモンの複雑な活性の発現機構の網羅的解析と、効率的な植物増産技術につなげることを目指す。例えばジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)は、F-box タンパク質 COI1 と転写リプレッサーJAZ のタンパク質間相互作用を誘起することで、JAZ のユビキチン化による分解を促して活性を発現する。モデル植物シロイヌナズナでは1種の COI1 に対して JAZ は 13 種のサブタイプが存在し、これらの組み合わせが複雑な応答を制御していると考えられる。JA-Ile の複雑な活性には、「食害や病原菌感染などの環境ストレスへの耐性をもたらす免疫応答」と、「生長抑制や老化誘導などの応答」など様々にあるが、JAZ のような遺伝的重複性の高い標的では解析が困難であり、どの JAZ がどの応答を制御しているかについては多くが解明されていない。これが制御できれば、過酷な環境でも生育する作物の作出につながるなどが期待される。

このような背景のもと、本研究ではいくつかの JAZ に選択的に結合する小分子リガンドを設計し、植物ホルモンの根幹となる複雑なシグナル伝達制御メカニズムを解明する有力なツールを開発する。サブタイプ選択的に結合するリガンドが複数開発できれば、それを用いて活性化できる JAZ サブタイプのバリエーションは無量大である。一方、様々な JAZ サブタイプの組み合わせを、何の指標もなく同時に遺伝子改変するのはほぼ不可能(例えば3種類の JAZ を同時に遺伝子改変する組み合わせは ${}_{12}C_3 = 220$ 通りにもなる)であり、サブタイプの様々な組み合わせを網羅的に解析し理解するには、このような化学的アプローチが有効な手段と考えられる。例えば植物の生長阻害を起こすことなく、環境ストレス耐性の付与のみを実現するケミカルツールを開発し、それら化合物を基盤にバイオマーカ一群を網羅的に解析して、ジャスモン酸応答、ひいては植物の生長と防御メカニズムの全容を解明することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

世界の農作物生産量の 10-15%は病害によって失われており、その解決は喫緊の世界的課題である。植物は病原菌に感染すると、ジャスモン酸と呼ばれる免疫ホルモンを分泌して様々な防御応答を活性化するが、防御に必要なエネルギーを産生するため生長を停止させる。この生長と防御のトレードオフを解消できれば、植物病原菌の感染を防ぐ強力な手段となるが、その制御メカニズムは不明な点が多く残されているのが現状である。ジャスモン酸の活性本体、ジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)は、F-box タンパク質 COI1 と転写リプレッサーJAZ とのタンパク質間相互作用(PPI)を誘起するが、JA-Ile は COI1 と 13 種類の JAZ サ

ブタイプのほぼ全ての組み合わせの相互作用を誘起することで、免疫応答や生長阻害／老化など様々な応答を同時に引き起こす。この複雑な活性を切り分ける分子の開発を目指す上で、まず全ての COI1-JAZ 共受容体に対する定量的リガンドスクリーニング系を世界に先駆けて開発した。この技術を用いて、JA-Ile の構造類縁体をリードとして COI1-JAZ との親和性を評価しつつ、構造最適化を施し、2 種類の共受容体にのみ結合する分子の開発に成功した。この化合物はモデル植物に対して生長阻害を引き起こすことなく、病原菌感染への抵抗性を示した。この成果は、化合物によって植物の生長と防御のトレードオフの関係が解消できる可能性を示唆するものである。また、JAZ 変異株等を用いたアッセイなどから、この選択的な遺伝子応答と病原菌耐性に、JAZ9 というサブタイプが主要な役割を果たしていることも明らかにするなど、ジャスモン酸シグナル伝達における重要な知見を得た。現在独自のスクリーニング系を拡張するとともに、新たな選択的 PPI 誘導技術を開発中で、様々な植物種に有用なケミカルツールの開発を検討している。

(2) 詳細

研究項目 A 「植物ホルモン類の誘導体化による選択的アゴニスト候補分子の合成と in silico 解析」

JA-Ile と、その構造ミミックで、COI1-JAZ 共受容体への強力なアゴニストであるコロナチン(COR)は、COI1-JAZ のタンパク質間の相互作用を誘起する糊付け分子として機能することが、過去の X 線結晶構造解析から明らかとなっている。この COR の全合成過程で得られる立体異性体は所属研究室で開発されており、それらを B で開発した JAZ サブタイプ選択性の評価系を用いて検討した結果、13 種類の JAZ サブタイプのうち少なくとも 5 種類のサブタイプに結合するサブタイプ選択的アゴニストのリード分子を見出した。この分子について、COI1-COR-JAZ1 の三次元立体構造を基にした in silico docking study を実施した。計算方法の最適化などを経て、このリード分子の結合様式について検討した結果、いくつかのサブタイプにおいて、COR のケトン部位への水素結合パターンの変化に気づき、この官能基を足がかりに誘導体化するという設計戦略に結びつけた。この分子設計指針に基づき、COR の立体異性体の誘導体化を行い、再びサブタイプ選択性を評価した結果、13 種類の JAZ サブタイプのうち 2 種類にのみ結合する分子を得ることに成功した。この研究方針を基に、COI1-JAZ に対するさらなる高活性な分子、あるいはこれまでと異なる有用な生理活性分子を開発する基礎を固めることができた。

研究項目 B 「サブタイプ選択的アゴニストの in vitro アッセイ系の構築」

本研究の目的である、特定の JAZ サブタイプ選択性を有する小分子リガンドを創製するには、まず 13 種類ある COI1-JAZ 共受容体全ての組み合わせのタンパク質間相互作用を正確かつ定量的に評価する実験系が必須となる。しかし研究開始当初は、酵母細胞を使った Yeast-two-Hybrid 法(Y2H)や、全長タンパク質を用いた pull-down アッセイ系が、各論文でいくつかの組み合わせでのみ評価されている状態であった。特に JAZ 全長タンパク質は溶液系で不安定であり、再現性良く定量的な解析を行うには問題が散見された。そこで、前述の COI1-COR-JAZ1 の X 線結晶構造解析に用いられた JAZ の結合ドメインを切り出した

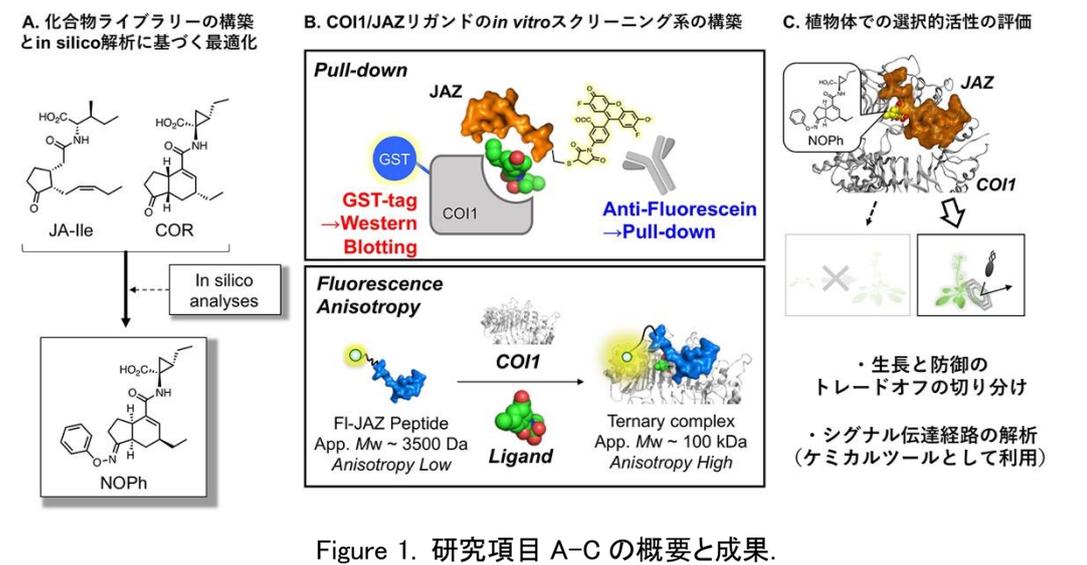
断片ペプチド(Jas motif)を利用し、このペプチドにエピトープとなる蛍光色素を導入した、蛍光色素コンジュゲート JAZ ペプチドを設計し、これを利用した binary-tag pull-down アッセイ系を構築した。これにより蛍光色素の高いモル吸光係数によって正確な濃度決定が可能となり、全 JAZ サブタイプを横並びに評価できるようになった。この手法を用いて、A で挙げたリガンドの focused library の結合親和性を正確に評価することで、サブタイプ選択的アゴニストの創製、および選択的な生理活性を有する候補分子を得ることに成功した。

ただし、受容体の種類自体が 10 種類以上あり、これらに対して多くの分子を複数同時に評価するためには、pull-down アッセイ系ではスループット性が低いことが問題となった。そこで、リガンド分子を混ぜてすぐに起こる COI1-JAZ 間のタンパク質間相互作用(PPI)を簡便に検出する新手法として、PPI の結合評価に広く用いられる「蛍光異方性」による解析を COI1/JAZ に適用した。具体的には、binary-tag pull-down システムで採用した蛍光修飾 JAZ ペプチドと、全長の COI1 とが相互作用する際、ペプチド側の見かけの分子量が劇的に増大する現象を利用することによって、リガンドの添加によって引き起こされる三者複合体形成を、異方性の増大で検出することができた。ただし元の分子設計では S/N 比が高くなかったため、結晶構造を基にした合理的設計によって色素とペプチドとのリンカー構造／導入位置、蛍光色素の種類などを最適化し、最終的に COI1/JAZ の PPI によって 2 倍以上にシグナルを増大させる系の開発に成功した。この手法は低濃度のリガンド添加にも鋭敏なシグナルの変化を引き起こし、その結果、リガンドの共受容体との親和性を定量的に解析することができ、これまで詳細に調べられていなかったジャスモン酸類(JA, JA-Ile, 12OH-JA-Ile など)の全ての COI1/JAZ サブタイプとの結合定数を得ることができた。また本評価系は、十分なシグナル変化によってプレートリーダーでの検出も可能であることから、ハイスループット化も対応でき、さらなる広範囲なリガンドをスクリーニングすることができるようになった。

研究項目 C 「モデルおよび実用植物での選択的リガンドの in vivo アッセイによる環境応答バイオマーカー群の機能解析」

研究項目 A, B で得られた JAZ サブタイプ選択的アゴニストの候補分子について、モデル植物シロイヌナズナを用いて、ジャスモン酸類の代表的な生理活性である生長阻害やアントシアニン蓄積、さらにはマイクロアレイ解析、およびジャスモン酸応答遺伝子のリアルタイム定量 PCR などで活性を評価した。その結果興味深いことに、COI1-JAZ9, 10 選択的なリガンドとして見出された NOPh という化合物が、植物の生長阻害を引き起こすことなく、病原菌耐性遺伝子である PDF1.2 などの転写を選択的に活性化することを見出した。実際に病原菌の一つとして necrotrophic pathogen の一つである *Alternaria brassicicola* の感染耐性試験を行ったところ、天然物である COR と同等に、この菌の感染耐性をもたらすことも実証できた。さらにこの分子が標的とする JAZ9 および 10 のノックアウト株 (*jaz9, jaz10*) による確認を行ったところ、*jaz10-KO* 株では活性が保持されるものの、*jaz9-KO* 株では全く活性が消失した。つまり、この分子の選択的な防御応答は JAZ9 の下流で起こっていることが示唆された。このように、曖昧ではあるがある程度のサブタイプ選択性を持つリガンドを in vitro で開発することにより、豊富にあるシロイヌナズナの変異株を組み合わせることで、素早く特定の生理活性を制御する JAZ サブタイプの同定につながる実証されたと考えられる。

現在、本研究方針で様々な植物において活性を担う受容体の特定、およびジャスモン酸類の引き起こす複雑なシグナル伝達の全容解明に向けて、さらなる検討を続けている。



3. 今後の展開

本さがけ研究にて、モデル植物の生長と防御を小分子リガンドで制御できることを示すとともに、病原菌感染に対する防御応答に強く影響を及ぼす受容体サブタイプの特定に成功した。このアプローチと今後の展開によって、他のサブタイプに選択的なリガンドの創製は実現可能性が高く、これらのケミカルツールによって、ジャスモン酸の持つ生長・病原菌耐性以外の生理応答（障害応答、有用二次代謝産物合成、老化など）に関わる受容体サブタイプ、あるいはそれらが冗長的に作用するネットワークを解析でき、ジャスモン酸に関わるシグナル伝達機構に重要な知見を与えるものと期待される。また、このアプローチによって同定された重要な共受容体をバイオマーカーとすることで、病気・害虫・環境変化に耐性のある作物などの創製につながる事が期待される。

4. 自己評価

当初の目標であった、植物ホルモン共受容体のサブタイプ選択的リガンドの作成と、それによって植物の生長と防御の制御、並びに防御応答に関連する受容体を同定することに成功し、小分子リガンドの精密設計と簡便かつ正確な評価系の構築が、共受容体のあいまい制御につながり、環境応答バイオマーカーの絞り込みと機能解明につながることを実証できた点で、一定の成果が得られたと考えられる。このアプローチを使って複数のリガンド開発とそれによって様々な環境応答バイオマーカーの同定までは実現できていないが、今後の展開によって環境応答型植物の設計・構築も可能となると期待され、引き続き検討を続けていく。

5. 主な研究成果リスト

- (1) 論文(原著論文)発表

1. Takaoka, Y.*, Nagumo, K., Azizah, I. N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., Ueda, M.*, A comprehensive in vitro fluorescence anisotropy assay system for screening ligands of the jasmonate COI1–JAZ co–receptor in plants, *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 5074–5081.
 2. Takaoka, Y., Iwahashi, M., Chini, A., Saito, H., Ishimaru, Y., Egoshi, S., Kato, N., Tanaka, M., Bashir, K., Seki, M., Solano, R., Ueda, M.*, A rationally designed JAZ subtype–selective agonist of jasmonate perception, *Nat. Commun.* 2018, 9, 3654.
 3. Takaoka, Y., Uchinomiya, S., Kobayashi, D., Endo, M., Hayashi, T., Fukuyama, Y., Hayasaka, H., Miyasaka, M., Ueda, T., Shimada, I., Hamachi, I.*, Endogenous membrane receptor labeling by reactive cytokines and growth factors to chase their dynamics in live cells, *Chem* 2018, 4, 1451–1464.
 4. Ueda, M.*, Hayashi, K., Egoshi, S., Ishimaru, Y., Takaoka, Y., Yamakoshi, H., Dodo K., Sodeoka, M.*, The alkyne–tag Raman imaging of coronatine, a plant pathogen virulence factor, in *Commelina communis* and its possible mode of action, *Org. Biomol. Chem.* 2018, 16, 3348–3352.
 5. Takaoka, Y., Imai, M., Shigenaga, M., Ueda, M.*, Design and synthesis of a second–generation ligand–tethered calcium indicator for plant cell biology based on the fundamental analyses of the structure and physical property, *Tetrahedron Lett.* 2017, 73, 3079–3085.
- (* corresponding author)

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 高岡洋輔、「ジャスモン酸受容体のサブタイプ選択性を制御する化合物の創製」植物化学調節学会 第 54 回大会、2019 年 11 月 15–17 日(とりぎん文化センター、鳥取県鳥取市)(奨励賞受賞講演)
2. Yousuke Takaoka, 「Development of subtype–selective agonist for phytohormone co–receptor, the 2nd International Symposium on Chemical Communications」, 2018 年 5 月 28–29 日(東北大学理学研究科、宮城県仙台市)(国際シンポジウム、招待講演)
3. Yousuke Takaoka, 「Development of subtype selective agonist for jasmonate co–receptor」, Asian International Symposium – Medicinal Chemistry (日本化学会第98春季年会)、2018 年 3 月 20–23 日(日本大学理工学部船橋キャンパス)(国際シンポジウム、招待講演)
4. Takaoka, Y., Hayashi, K., Suzuki, K., Azizah, I. N., Ueda, M. Fluorescence anisotropy–based comprehensive method for in vitro screening of COI1–JAZs agonist/antagonist, *Methods Mol. Biol.*, 2020, 2085, 145–160.
5. 東北大学・理化学研究所、「植物の病原菌感染を防ぐ画期的な植物免疫強化剤を開発」、2018 年 9 月 18 日(プレスリリース)

研究報告書

「非定常光環境におけるイネ光合成の遺伝的制御の包括的解明」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研究者： 田中 佑

1. 研究のねらい

植物の葉における光合成は、地球の炭素循環や植物の物質生産の基本となる生命現象である。これまで定常条件における葉の光合成能力については多くの研究がなされてきた。しかしフィールド環境において生育する植物は、常に変動する環境にさらされている。特に光合成の直接のエネルギー源となる光強度は、日周変化だけでなく雲による遮蔽や植物の葉自体による相互被陰のため、秒単位で大きく変動している。このような変動光条件下で光合成は大きく影響を受けていると考えられるが、実際にフィールドで生育する植物がどのような光合成応答を示しているのかについては、不明な点が多く残されている。

本研究では特に、光強度が急激に増加した場合の光合成の立ち上がり(光合成誘導反応)に着目した。この際、光合成速度はすぐには応答せず、ある程度の遅れをもって次第に上昇していくことが知られている。変動光条件下では光合成誘導反応が繰り返し起こっていると考えられることから、誘導反応に伴う光合成の立ち上がりの遅れによって、積算光合成量には損失が生じていると想定される。したがって、光合成誘導反応を速めることができれば、変動光条件下での物質生産性を向上させられる可能性がある。

本研究では主要作物であるイネを対象に、普及品種のコシヒカリ、多収品種のタカナリと両者の交雑から得られた系統群、および世界のイネコアコレクションを用いて光合成誘導反応の評価を行うことで、光合成誘導反応に関与する染色体領域の特定をめざした。光合成誘導反応には気孔の応答や CO₂ 固定にかかわる酵素 Rubisco など複数の要因が関与していると考えられる。これらのうち、光合成誘導反応を左右している主要な生理的要因を解析した。さらに光合成誘導反応を改変することで、変動光条件下での積算光合成量に及ぼす向上効果をシミュレーションモデルにより定量化した。

以上を通し、変動光に対する光合成誘導反応を育種的に改変する可能性と、それによる作物の光合成最適化、および物質生産性の新たな向上戦略を提示することを本研究の目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

暗処理後の植物体に突然の強光照射を行い光合成の動態を観察することにより、多収イネ品種タカナリは、コシヒカリと比較して光合成誘導反応が速いことが確認された。タカナリの速い光合成誘導反応は、主には高い気孔コンダクタンスによりもたらされていたが、電子伝達や葉内の CO₂ 固定活性も無視できない影響を与えていた。両品種の交雑から得られた染色体断片部分置換系統群(CSSLs)を用いた解析から、12 番染色体の長腕にタカナリ由来で光合成誘導反応を速める QTL が見出された。同 QTL を有することで、光合成誘導反応が大幅

に促進されることが複数年次で確認された。

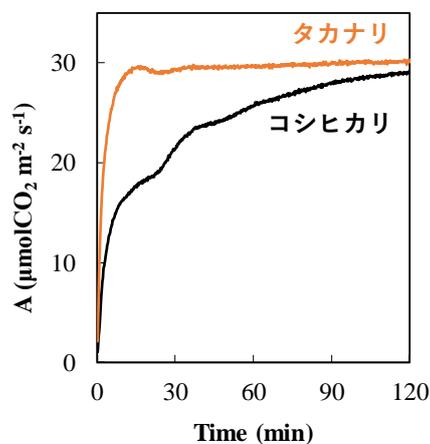
イネの遺伝的変異を最大限網羅した品種セット、世界のイネコアコレクションには光合成誘導反応に大きな変異が存在しており、タカナリよりも優れた光合成誘導反応を示す系統が複数存在していた。見出された遺伝的変異は、弱光条件下での光合成速度や気孔コンダクタンスと強く相関していた一方で、最大光合成能とは相関がなかった。光合成誘導反応には、イネの生態型により偏りがみられ、温帯ジャポニカ系統はコシヒカリを含め誘導反応が遅い傾向がみられた。

光合成誘導反応を組み込んだ光合成シミュレーションモデルを構築した。圃場において実際に観察された光強度を入力としたところ、光合成の立ち上がりの遅れによって、潜在的な炭素固定量の最大 30%程度を損失していると予想された。さらに、光合成誘導反応の自然変異を育種的に利用できたと仮定すると、この損失は大幅に低減し、フィールド環境におけるより効率的な物質生産が可能になると予測された。次に圃場におけるより複雑な光強度の変動を再現し、12 時間にわたる光合成動態を観察したところ、タカナリはコシヒカリと比較し午前中から光合成速度が高いものの、午後はその差が縮小あるいは逆転することが明らかとなった。本研究で見出した QTL は、午前中の光合成速度を向上させる効果のあることが明らかとなった。

(2) 詳細

研究テーマ A「コシヒカリ・タカナリの染色体断片置換系統群を用いた time-related mapping」

コシヒカリ、タカナリと両品種の交雑から得られた染色体断片部分置換系統群(CSSLs)を解析したところ、タカナリでは光合成誘導反応が速く(右図;論文業績2)、12 番染色体の長腕にタカナリ由来で光合成誘導反応を速める QTL が3年続けて検出された。変動光条件においてイネの光合成誘導反応に遺伝的差異が存在しており、かつそれに影響する QTL の特定は初の事例であり、研究目的の一つを達成することができた。同 QTL は既存の最大光合成能に関する QTL とは別の領域であり、これを *qRaise1*(Rapid Induction Response)と命名した。



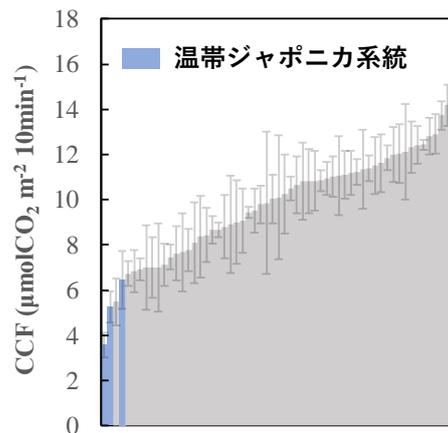
光合成誘導反応の品種間差

当初は、光合成誘導反応は複雑な生理現象であり、関与する遺伝的要因も多数にわたると想定された。しかし実際には、コシヒカリとタカナリの間では *qRaise1* が主働的な QTL であることが明らかとなった。*qRaise1* の効果により、光合成誘導反応時の光合成、気孔コンダクタンス、葉肉コンダクタンス、電子伝達速度がいずれも向上していたことから、*qRaise1* は複数の光合成プロセスに影響する遺伝的要因であることが明らかとなった。従って以下の研究テーマについては、当初の研究方針を維持しつつ、*qRaise1* の作用メカニズム解明と物質生産への影響により重点を置いた。

研究テーマ B「親品種および代表的な系統における光合成誘導反応中の遺伝子発現の網羅的解析」

コシヒカリおよびタカナリの光合成誘導反応中の葉のメタボローム解析を行ったところ、カルビン-ベンソン回路の多くの構成要素に品種間差が検出された(論文業績2)。しかし差が検出された構成要素はいずれも相互作用しており、このうちどのプロセスが品種間差の根本的な原因となっていたのかを特定するには至らなかった。一方、*qRaise1* の原因となる遺伝子を特定するため、*qRaise1* を有する CSSL をコシヒカリに戻し交配し BC₁F₃ 分離系統群を育成した。同系統群を用いたファインマッピングにより、*qRaise1* の存在領域を 400kb 程度にまで絞り込むことに成功した。

世界のイネコアコレクションはイネの遺伝的変異を最大限網羅するよう設計された品種セットである。コアコレクションの光合成誘導反応には幅広い変異が存在しており(右図)、最大光合成能とは相関がなかった。*qRaise1* が既知の最大光合成能に関する QTL とは別の領域に検出されたことと併せ、光合成誘導反応は最大光合成能とは独立したメカニズムで制御されていると考えられた。加えて、温帯ジャポニカ系統はコシヒカリを含め光合成誘導反応が遅い傾向がみられた。今後さらに系統数を増加させた検証が必要ではあるが、生態型による光合成誘導反応の偏りは、何らかの適応的意義もしくはトレードオフの存在を示唆している。



世界のイネコアコレクションにおける強光照射後 10 分間の積算光合成量の遺伝的変異

研究テーマ C「フィールド光環境における光合成速度を関連遺伝子群およびその発現レベルから予測する数理モデルの構築と最適遺伝子型設計」

水田群落において長期間にわたる光条件を取得し、そのうち典型的な変動光を示した条件について以下の解析に用いた。まず、光合成誘導反応の影響を組み込んだ群落光合成モデルを作出した。本モデルに光条件を入力し光合成誘導反応が物質生産に及ぼす影響の定量化を試みたところ、コシヒカリでは潜在的な物質生産量のうち約 33%を損失していると推定された。タカナリの光合成誘導反応をコシヒカリに導入したと仮定すると、損失は 28%程度にとどまり、光合成誘導反応の育種改良によって物質生産量を 5%程度向上させうると予測された(論文業績1)。

同じ変動光条件を光合成測定装置内で再現することに成功した。コシヒカリ、タカナリについて 12 時間にわたる変動光条件下での光合成動態を測定したところ、タカナリは午前中から昼頃にかけて非常に高い光合成速度を示したが、午後になると品種間差が小さくなり、最終的には差が消失した(論文業績2)。*qRaise1* の導入によって午前中の光合成速度が高まることが確認された。すなわち、光合成誘導反応の改良によって変動光条件下での生育に適したイネを設計可能であることが、理論・実測の両面から確認された。

結論

本研究によって、イネの光合成誘導反応には大きな遺伝的変異が存在しており、育種的に利用可能であることが明らかとなった。特定された QTL はコシヒカリ、タカナリ間の品種間差の大部分を説明する効果の大きな QTL であった。同 QTL の活用によって、フィールドにおける変動光条件下での生育に適したイネの設計が可能であり、物質生産性を 5%程度向上可能であることが強く示唆された。イネの物質生産性向上に向けた新たな戦略を提示することができた。

3. 今後の展開

コシヒカリ、タカナリ間の光合成誘導反応の差をもたらしている要因は、今後さらに明瞭になると思われる。それを踏まえ、既存のイネ品種の光合成誘導反応を育種的に改良し、変動光条件において高効率に生育するイネの作出実現を目指す。

世界のイネコアコレクションの中には、タカナリと比較し、さらに光合成誘導反応が速い系統も見出される一方、生態型間での偏りが見出された。すなわち、本研究でとらえた 2 品種間の差異はイネ全体の遺伝的多様性のごく一部であり、光合成誘導反応には未知のメカニズム、およびトレードオフや適応的意義が存在していると考えられる。今後は以上の点に留意しつつ、より幅広い遺伝資源を活用しながら、フィールドの変動光環境下で求められる“理想の光合成”の包括的理解と設計を目指すべきであると考えられる。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】本研究の目的は、(A)光合成誘導反応に関わる QTL の特定、(B)その遺伝学的・生理学的メカニズムの解明、(C)モデルに基づく高効率な光合成を行うイネの設計、の 3 点であった。このうち(A)については、効果の大きな新規 QTL を検出したことで期待通りに達成できた。(B)については、遺伝子発現の網羅的解析には至らなかったが、メタボローム解析やファインマッピング、光合成生理解析によって光合成誘導反応のメカニズムの一部を解明することができた。(C)については、モデルと実測の両面から、同 QTL を導入した効果を定量化したことで達成できたと考えられる。

【研究の進め方】本研究の遂行にあたり、研究費の大部分は最新型の光合成測定装置の導入に用いられた。これにより、一般に時間と労力を要する光合成測定を、最小限の時間で効率的に行う研究環境を整備することができた。フィールド環境で生育するイネを研究対象としたことで、実験は基本的に夏期のみに制限されたものの、上記のように所期の目的をおよそ達成することができた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】変動光条件における光合成誘導反応について、イネの種内で自然変異を見出したこと、および効果の大きな QTL を特定したことは学術的新規性が高く、植物の光合成生理の理解の進展に貢献すると考えられる。社会的要請に沿ったイネのバイオマス生産性の向上を実現できれば、大きな経済波及効果が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Shunsuke Adachi, Yu Tanaka, Atsuko Miyagi, Makoto Kashima, Ayumi Tezuka, Yoshihiro Toya, Shunzo Kobayashi, Satoshi Ohkubo, Hiroshi Shimizu, Maki Kawai-Yamada, Rowan F Sage, Atsushi J Nagano, Wataru Yamori
High-yielding rice Takanari has superior photosynthetic response to a commercial rice Koshihikari under fluctuating light. *Journal of Experimental Botany* (2019) 70: 5287–5297.

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 世界のイネコアコレクションにおける変動光応答性の遺伝的変異
谷吉 和貴, 田中 佑, 白岩 立彦
第 247 回日本作物学会講演会 (優秀発表賞) (2019) 筑波大学
2. Natural Variations of the Non-Steady State Photosynthesis among Rice and Soybean Varieties
Tanaka, Y., Kobayashi, S., Tanaka, K., Kondo, R.
International Symposium on Agricultural Meteorology 2018, Kyushu University, March 16th, 2018
3. 変動光環境におけるイネ個葉の光合成動態とそれに及ぼす光合成誘導反応の影響
小林 俊造, 田中 佑, 白岩 立彦
第 244 回日本作物学会講演会 (優秀発表賞) (2017) 岐阜大学
4. Continuous monitoring of the canopy gas exchange of rice and soybean based on the aerodynamic analysis of the plant canopy
Tanaka, Y., Katayama, H., Kondo, R., Homma, K., Shiraiwa, T.
The 9th Asian Crop Science Association Conference, Jeju, Korea, June, 2017
5. Natural genetic variation of the photosynthetic induction response to fluctuating light environment.
Tanaka, Y., Adachi, S., Shiraiwa, T.
Current Opinion in Plant Biology (2019) 49:52–59.

研究報告書

「頑健な植物共生システム的设计に向けた「コア共生微生物」探索技術の開発」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016年10月～2020年3月

研究者： 東樹 宏和

1. 研究のねらい

土壌中には様々な細菌や真菌が生息しており、植物に土壌養分(窒素・リン)を供給するとともに、病原生物や環境ストレスから植物を保護している。野外環境における植物の健全な生育には、こうした「微生物叢」の機能が欠かせない。

根内共生真菌を対象としたこれまでの研究から、これまであまり研究対象となつてこなかった「内生菌」とよばれる菌類が、「コア微生物」として共生叢全体の動態を制御している可能性が浮上してきた。こうした内生菌の中には、菌根菌と植物体内で頻りに同居するものが存在する。内生菌のほうが菌根菌よりも感染率が高い一般的傾向が見出されること、また、菌根菌単独の接種による菌根共生が一般的に不安定であることを考慮すると、これまで機能未知とされてきた内生菌の「隠れた」働きに光をあてることができる。

内生菌がコア微生物であることが一般的であるとすれば、応用科学分野への影響は計り知れない。菌根菌であるマツタケの栽培が難しいことに代表されるように、菌根共生を人為的に制御するのは極めて困難である。しかし、植物と菌根菌の関係を内生菌がコア共生微生物として仲介しているのであれば、菌根菌の利用技術が一挙に発展すると期待される。菌根菌と違い、内生菌には培養が容易なものが多い。そのため、植物と共生させたい菌根菌と親和性の高い内生菌系統を植物の種子や実生に感染させることで、植物の健康状態を生涯にわたって維持できる可能性がある。

本研究プロジェクトでは、自然生態系や農業生態系における野外調査、生物叢分析、および理論生態学的なビッグデータ分析を融合し、コア微生物を特定する技術の開発と日本列島におけるコア微生物のリスト作成を行う。さらに、コア微生物の候補として浮上した菌種について、植物種苗への接種試験を実施し、実際の効果を検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

日本列島全域の様々な生態系を対象に、数百・数千の植物根サンプルを採集する野外調査を実施するとともに、DNA メタバーコーディング (amplicon sequencing) によって得られた膨大なデータを基に生物間の関係性を探索する新手法を開発し、「地下共生ネットワーク」の全体像を解明した(図1)。その結果、森林・草原において生態系の要となる内生真菌 (*Cladophialophora chaetospora* 等)を見出すことができた。

こうした内生真菌は、無数の微生物種で構成されるシステム全体を安定化している可能性がある。そこで、内生真菌を利用して機能と頑健性を高めた「コア微生物叢」を設計する技術を開発した。中核として埋め込む微生物叢によって、野外環境下における生物/非生物ストレスに対する植物の抵抗性を高める基盤となる技術である。この「コア微生物叢が『鎧』と

なって植物を護る」戦略により、ストレス耐性と資源利用効率が高い農業を目指した新たな科学的アプローチを提案した。

従来、植物共生微生物に関する研究は、少数種の植物や菌に対象を絞って行われてきた。しかし、生態系レベルで起こり得る現象を予測・制御するためには、「全体像を一挙に解明した上で中核(コア)種を見出す」アプローチが必要である。さらに、コア種を最適配置して微生物叢を設計する構成的な科学領域を創成することで、食糧問題という人類共通の課題に新たな解決の糸口を提供できるであろう。

開発してきた一連の生物叢分析技術に関しては、植物や微生物以外にも適用が可能で、様々な生物に応用範囲を広げている。農業分野以外からの問い合わせも多く、食品・医療・環境ビジネスといった様々な産業領域の関係者および企業と研究協力体制を築いてきた。日本が主導権を握る新たな研究領域として、技術基盤の開発を今後も進めていきたい。

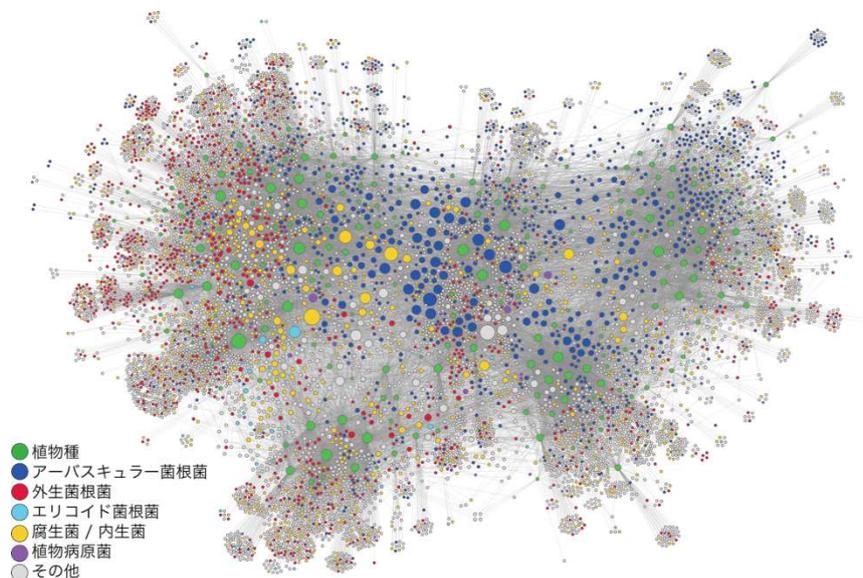


図 1. 150 種の植物と 8080 種の真菌で構成されるネットワーク。北海道から沖縄で行った微生物資源の調査に基づき、どの植物からどの真菌が検出されるかを網羅的に分析。(Toju et al. 2018 *Microbiome*)

(2) 詳細

課題 1. 「共生叢タイプ」と「コア共生微生物」にみられる一般則

北海道から沖縄までの多様な自然生態系・農業生態系で野外調査を行い、総計 400 種以上の植物について根や葉、根圏土壌に生息する細菌/真菌類の群集構造を解明した(図 2)。こうした地道な研究により、北日本および南日本のそれぞれにおいて、宿主植物の範囲が極めて広い内生菌をスクリーニングすることができた(図 1)。こうした菌類のなかには、各種野菜を始めとする草本作物種だけでなく、木本植物種にも共生できるものが含まれ、農林業の幅広い領域に応用が見込まれる。

また、こうしたスクリーニング研究を農地に適用した研究では、ダイズ根こぶ線虫を捕食する 5 種の菌類からなる「コンソーシアム」を発見した(図 3)。根こぶ線虫は、臭化メチルやクロロピクリンを用いた土壌消毒でも完全に封じ込めることができず、化学農薬への規制が EU

圏で強まる中、農業生産における主要なリスクファクターになりつつある。微生物多様性解析やネットワーク科学の融合で得られた上記成果は、微生物叢の制御による防除への第一歩となるものである。その他にも、作物品種間の微生物叢の違いや、農地管理法によって生じる微生物叢の違いに関する分析を行った(図 2 右)。膨大なデータを俯瞰したところ、一般的に、細菌叢よりも真菌叢において、農法や作物品種間による影響が顕著に現れることが明らかになった。

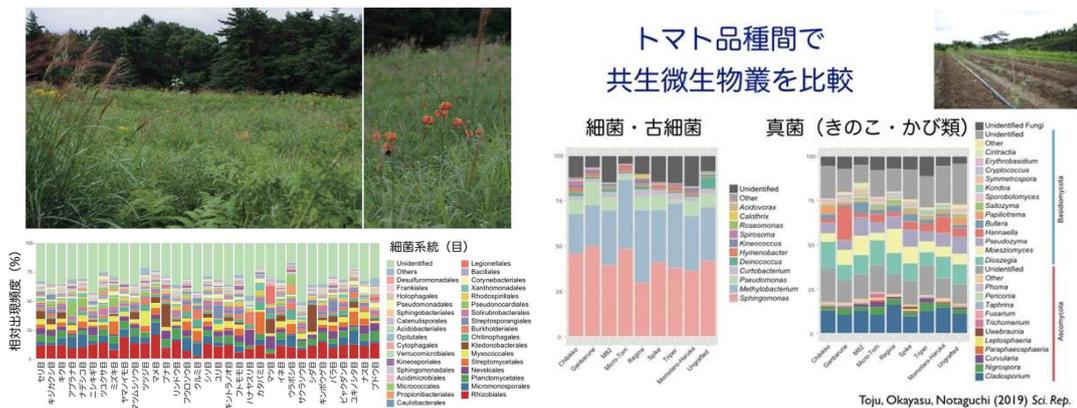


図 2. 草原生態系における植物 33 目 137 種に共生する細菌・真菌類のスクリーニング研究(左)と農業生態系におけるトマト接ぎ木品種間の微生物叢の比較(右)。Toju et al. 2019 *Frontiers in Microbiology* および Toju et al. 2019 *Sci Rep*.

化学農薬でも抑制しきれない線虫被害 - 微生物叢による制御に向けて -

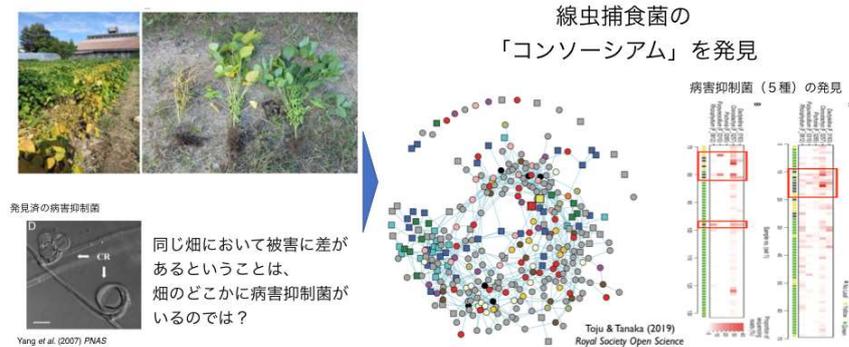


図 3. 根こぶ線虫を捕食・抑制する微生物コンソーシアムの解明。Toju & Tanaka 2019 *Royal Soc Open Sci*.

課題 2. 植物種を超えて適用できる「コア共生微生物」探索のインフォマティクス

これまでの生命科学では、遺伝子という単位の組み合わせによってゲノムをデザインし、生物機能を最適化するアプローチが主流であった。一方で、生物の群集構造に関する情報を大量に得ることができるようになった現在、「生物種を単位として、生物叢のレベルで機能や安定性を最適化する」新しい科学的アプローチを開拓することが可能となりつつある。微生物叢レベルにおける機能と安定性を最適化する戦略について提案し、その中核技術を

Nature Plants 誌で発表した(図 4)。微生物間の関係性を示す共起ネットワーク(co-occurrence networks)内において、それぞれの微生物種が持つ特性(窒素固定能や病原性)を考慮し、1) 機能的な土壌微生物をリクルートする役割、2) 植物体への病原生物の侵入阻止、3)微生物同士の相性、の 3 点で、種苗に予め接種すべきコア微生物を探索する数学的指標を構築した。この成果は、Web of Science における被引用上位 0.1% hot paper に認定された(animal & plant science 部門)。

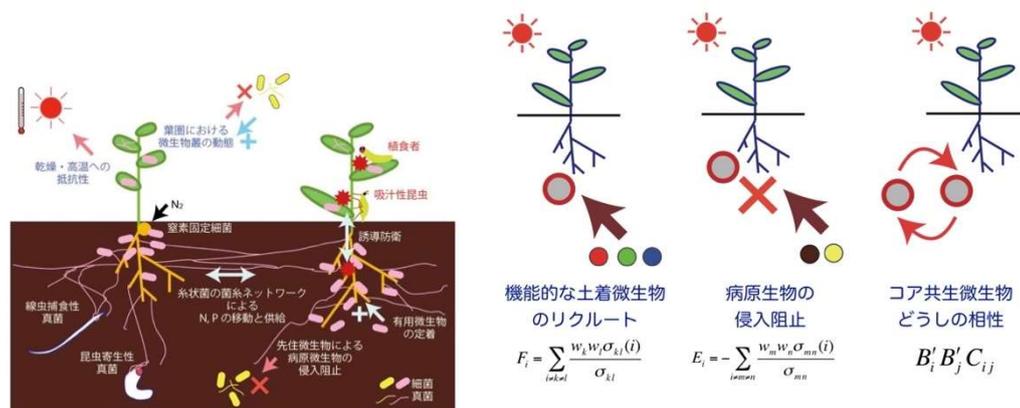


図 4. 「コア微生物叢」を設計するための 3 つの基準とその指標。Toju *et al.* 2018 *Nature plants*.

課題 3. コア共生微生物の接種をつうじた農地生態系の管理基礎技術

日本各地の様々な生態系から、菌類資源の収集を進め、3000 菌株のコレクションを作成した。この中から、課題 1 と課題 2 によって「コア微生物」と推定されたものを選び出し、植物体への接種試験を実施した。

その結果、上記で開発した微生物種の評価指標によって、植物の生育を大きく促進する内生真菌を実際にスクリーニングできることが明らかになった(図 5)。また、農地土壌の微生物叢に関するデータに同様の分析技術を適用したところ、土壌真菌についても、作物種の枠を越えて成長を促進する種を特定できることが判明した。さらに、複数微生物種の組み合わせに関する接種試験を実施し、植物の生育を促進する種の組み合わせを見出した。

以上により、野外調査・DNA メタバーコーディング・理論生態学的解析・接種試験を組み合わせた新しいアプローチにより、迅速かつ効率的に農業上有望な菌のスクリーニングを行えることを示すことができた。



図 5. データベース内から選定した菌種を接種したトマト(右)と接種していないトマト(左)。

3. 今後の展開

本研究プロジェクトにより、以下の研究資源を蓄積することができた。

- 日本列島全域を対象とした、植物共生微生物叢および土壌微生物叢のデータベース
- 膨大な微生物種のリストの中から、農業上有望なものを絞り込む技術
- 機能をカスタマイズした微生物叢を設計する技術
- 特殊な植物内生菌や土壌菌の菌株コレクション(3000 菌株)
- 微生物の高効率接種試験システム
- 複雑微生物叢の動態予測システム

本さがけプロジェクトでは、膨大な微生物資源のなかから有望なものを効率的に絞り込む技術の開発に集中したが、今後はその例となる微生物種について、de novo ゲノム解読や RNA-seq 等の遺伝子発現解析を進め、生理学的な機能を詳細に解明していきたい。そうした知見を蓄積することで、生態系の中で中核的な役割を演じる微生物種に共通した特徴が浮かび上がってくると期待される。

様々な産業分野の企業から、共同研究契約や学術指導契約の締結依頼を受けるようになってきたため、応用研究と基礎研究をフィードバックさせ、開発を加速していきたい。

4. 自己評価

本プロジェクトでは、野外(フィールド)環境における泥臭い調査や各種技術の開発、接種試験による検証と、広範な領域を個人研究として展開しなければならなかったため、非常に慌ただしいプロジェクトであった。加えて、微生物叢という、科学的な取り扱いがまだ固まっていない研究対象を扱う新領域であったため、アドバイザーの要求も厳しく、理解を得るのが難しい局面もあった。最終的に、さまざまな産業分野の企業から引き合いがある技術体系の核を構築することができ、基礎科学における革新と応用科学への展開の両面において、成果を上げることができたと自負している。研究業績としても、12 報の論文を出版し、Web of Science 高被引用文献(上位 0.1%)も出すことができた。

フィールド植物制御だけでなく、さがけ交流会などを通じて、さまざまな分野の研究者との交流ネットワークを構築することもでき、総じて、生産性の高い 3 年半であった。今後は、さらなる基礎科学における革新を目指しつつ、応用分野における科学者としての責任を果たせるよう、アカデミア・産業界双方のネットワークをつなげる活動を展開していきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y, Yoshida K, Schlaeppi K, Bai Y, Sugiura R, Ichihashi Y, Minamisawa K, Kiers ET. (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. <i>Nature Plants</i> 4:247–257 |
| 2. Toju H, Tanabe AS, Sato H (2018) Network hubs in root-associated fungal metacommunities. <i>Microbiome</i> 6:116 |
| 3. Toju H, Kurokawa H, Kenta T (2019) Factors influencing leaf- and root-associated communities of bacteria and fungi across 33 plant orders in a grassland. <i>Frontiers in Microbiology</i> 10:241 |
| 4. Toju H, Tanaka Y (2019) Consortia of anti-nematode fungi and bacteria in the rhizosphere |

of soybean plants attacked by root-knot nematodes. Royal Society Open Science 6:181693

5. Kadowaki K, Yamamoto S, Sato H, Tanabe AS, Hidaka A, Toju H (2018) Mycorrhizal fungi mediate the direction and strength of plant-soil feedbacks differently between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal communities. Communications Biology 1:196

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 「日本列島の多様な菌から農業利用可能なものを選別
～植物150種と真菌8,080系統からなる巨大ネットワーク・データ～」
京都大学・JST 共同プレスリリース(2018年6月26日)
2. 「微生物界の「キーパーソン」を農業に役立てる」JST News 2018年9月号
3. 東樹宏和. 「複雑微生物叢の制御は可能か?」. 2019年度発酵と代謝研究会第1回勉強会. 2019年7月12日. 一般財団法人バイオインダストリー協会. 【招待講演】
4. 東樹宏和. 「複雑微生物叢を設計・制御する;「コア微生物叢」の組み立て」. シンポジウム「次世代のバイオプロセスを拓く複合微生物系精密制御技術」. 第71回日本生物工学会. 岡山大学. 【招待講演】
5. 東樹宏和. 「大規模ネットワーク分析による菌叢動態の解明と制御」. シンポジウム「植物微生物研究で共創する未来」. 第33回日本微生物生態学会. 山梨大学. 【招待講演】

研究報告書

「共生微生物群の機能解析とその活用による植物生長促進技術の開発」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016年10月～2020年3月

研究者： 晝間 敬

1. 研究のねらい

植物は無数の微生物群と相互作用しており、植物の環境適応に不可欠な役割を担っていることが徐々に明らかになってきている。一方で、これまでにそのメカニズムに関するある一定の知見が得られている共生微生物はむしろ特殊な共進化を経た全体から見ると例外的な微生物であるのに対して、宿主植物と相互作用するその他大多数を占める微生物群の潜在的な機能に関する知見は依然極めて乏しい。また、共生微生物の多くは病原(寄生)菌とも近縁であり、その潜在的な寄生性を発揮させないように活用することが重要となってくるが、そもそも共生や寄生を規定し両者を区別する分子メカニズムは個別論で見ても明らかではないのが現状である。さらに、分子メカニズム解明に適した一部モデル共生微生物についても、そのほとんどは他の微生物を極力除外し、周辺環境が制御された実験室条件で行われていることから、周辺環境がしばしば予測不可能な形で変動し、かつ、他の無数の土壌・根圏微生物叢と共存・競合する必要があるフィールドでの共生微生物の振る舞い、および、それを支える仕組みは明らかになっていない。

研究者は、これまでにモデル植物シロイヌナズナをはじめとするアブラナ科植物の根に無病徴感染し、リン欠乏環境においては自身の菌糸を介してリンを宿主植物へと提供することで植物の生長を促す共生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) を発見している (Hiruma et al., 2016)。本研究開始前に、特定の土壌においては、土壌微生物を滅菌した区と比較して、滅菌していない区において *Ct* による植物生長促進効果(共生効果)がむしろより顕著に認められることを発見した。このことから、*Ct* と土壌・根圏微生物叢が協調的に相互作用することにより、微生物叢による共生効果がさらに促進あるいは安定化される可能性が考えられた。一方で、土壌のタイプによっては、無滅菌時に *Ct* 接種によって植物生長が阻害されるケースもあったことから、土壌・根圏微生物は協調的に働く場合もあれば、負の影響を与える場合もあることが示唆された。そこで、研究者が整備した本実験系を用いることにより、土壌・根圏微生物間の複雑な相互作用から生み出される植物に対する正負の感染効果の背景について理解を深められることが期待された。

以上の背景のもと、本研究においては、*Ct* とアブラナ科植物(シロイヌナズナおよび野菜)をモデルとして、豊富な土壌微生物が存在するフィールド環境で、共生糸状菌と土壌・根圏微生物叢との協調的もしくは競合的な相互作用を可視化することをまず目指した。次に、微生物叢と植物との間の複雑な相互作用の結果生み出された、植物に対する共生効果に着目して制御実験環境でその効果を再構築することを目指した。さらに、様々なフィールド環境で単離された多彩な感染様式を持つ *Ct* 株の比較機能解析を元に、植物感染共生糸状菌の感染戦略を支える分子基盤の理解を深めることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、共生糸状菌 *Ct* と他の微生物叢の相互作用が植物との共生関係に与える影響を調査することを目的とした。

第一に、フィールドでの接種試験に最適な *Ct* 株の単離同定を目指し、その結果、Hiruma et al., 2016 で用いた *Ct* スペイン株と同等以上の共生効果を実験室条件で発揮する日本由来の *Ct* 株の同定に成功した。

第二に、同定した *Ct* 日本株を用いてフィールド試験を複数回行ったところ、*Ct* 株は人工肥料を加えていない処理区においてコマツナなどの生長を著しく促すことを発見した。興味深いことに、*Ct* 株による植物生長促進効果が認められた際には、土壌中の可溶性窒素が不足していた一方で、可溶性リン酸は豊富に存在していたことから、*Ct* 株はリン欠乏条件に加えて窒素枯渇条件でも植物生長を促すことができることが考えられた。

第三に、*Ct* 接種が他の根圏微生物叢の構成に与える影響についてメタゲノム解析などを通じて調査した。その結果、*Ct* 感染によって、根圏細菌叢の構成が有意に変化した。共生効果が顕著に発揮される条件では根圏細菌の構成が特に顕著に変化した。以上のことから、*Ct* は共生効果発揮時に特定のタイプの細菌を根圏に誘引することが示唆された。

第四に、*Ct* によって誘引されるタイプの細菌群の詳細な解析を行うため、*Ct* 感染時の根から細菌を単離した。*Ct* 感染時の根から複数回の試験で共通して単離された 10 種類の細菌群および 1 種類の酵母に着目して、それらを混合した人工微生物集団によるリン欠乏条件および窒素欠乏条件での植物生長への影響を調査した。その結果、人工微生物集団接種はリン欠乏条件においては植物生長を著しく阻害したのに対して、窒素欠乏条件では植物生長に寄与した。さらに、*Ct* を同時に接種することによって、リン欠乏条件で人工微生物集団が引き起こす植物生長阻害をキャンセルするだけでなく、窒素欠乏条件では人工微生物集団と協調的に植物生長を促すことが判明した。以上のことをふまえると、フィールド環境下で *Ct* 接種時に認められた植物生長促進効果の背景には、糸状菌と細菌叢との間の協調的な相互作用が存在していることが考えられた。

最後に、フィールド環境で単離された *Ct* 寄生株と *Ct* 共生株の比較機能解析を行った。その結果、共生株との相互作用に必要な新規の宿主因子の同定に成功した。さらに、寄生株が植物ホルモンであるアブシシン酸および関連二次代謝物を活用することでその病原性を発揮していることを発見した。

(2) 詳細

研究テーマ A「フィールド環境での *Ct* による植物生長促進を支える機構について制御環境（実験室）で紐解く」

フィールド試験を行うためには、海外産の *Ct* 株は使用できないという制約があった。そこで、研究者は、第一に、フィールド環境での試験が可能な日本産 *Ct* の中から、スペイン産 *Ct* と同等以上の共生効果を制御実験環境で発揮する株の同定を目指した。複数のアブラナ科植物に対する植物生長促進効果の程度や、感染時に宿主植物の遺伝子発現応答に与える影響を調査した結果、*Ct4* がスペイン株と同等以上の共生効果をシロイヌナズナやコマツナ

などの複数のアブラナ科野菜に対して示すことが明らかになった。一方で、興味深いことに、*Ct3* は同一条件で植物の生長を著しく阻害した(後述)。また、同時に *Ct* と類似した機能を持つ菌株の単離を目指す目的で、貧栄養なフィールドで生育させたアブラナ科野菜から糸状菌を数百種類単離した。その結果、宿主根圏で特異的に起こる近縁の病原菌との競合を通じて、植物を病原菌から守る *Colletotrichum fructicola* を新たに発見した。一方で、*Ct4* と同等以上にリン欠乏条件下で植物生長を促す糸状菌は単離されなかったことから、以降のフィールド試験は *Ct4* に絞って進めることにした。

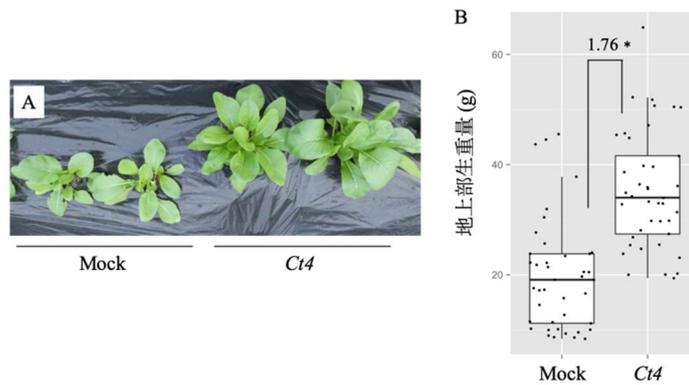


図1. 共生菌*Ct4*によるフィールド環境における植物生長促進効果
 A., *Ct4*接種の有無による植物地上部サイズの比較
 B., *Ct4*接種の有無による植物地上部生重量の比較 グラフ内の数字 (1.76) は*Ct4*/Mockの比を示す。* ($p < 0.01$)

フィールド試験は *Ct4* に絞って進めることにした。

第二に、フィールド環境で共生菌 *Ct4* の効果を調査するために、奈良先端科学技術大学院大学の実験圃場にて異なる季節でのフィールドでの微生物接種試験を行った。その結果、人工肥料を投与していない実験区において、*Ct4* がコマツナなどのアブラナ科野菜の植物生長を著しく促すことを 2

年連続の秋と冬の両方の季節で見出した(図 1)。制御実験系と比較してフィールド環境での植物生長促進効果の方がむしろ顕著であった。一方で、人工肥料を(過剰に)添加した区では顕著な植物生長促進効果が認められなかった。以上から、*Ct* 活用のためには、用いる肥料の質・量を検証していく必要性もあることが同時に判明した。

第三に、*Ct* がフィールド環境および実験室環境で植物生長促進効果を示す際に根圏細菌群の多様性を高める形で微生物叢の構成を変化させることを、メタゲノム解析などを通じて発見した。一方で、根圏糸状菌の構成は *Ct* の感染の有無で有意に変化しなかった。したがって、*Ct* が何らかの仕組みで特定のタイプの細菌叢を根圏に誘因していることが示唆された。

第四に、*Ct* 感染時に顕著に根圏に存在し、貧栄養環境にも適応した細菌群を単離した。次に、単離した 10 種類の細菌群および 1 種類の酵母と *Ct* を無菌環境で植物に共接種した(再構築実験)。その結果、リン欠乏条件下では、細菌群による植物生長への負の影響を *Ct* がキャンセルした。一方で、可溶性窒素が枯渇した条件下では細菌群と共同で植物の生長を促すことを発見した(図 2)。

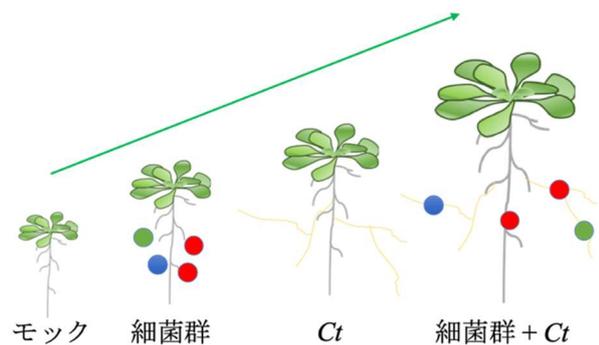


図2. 窒素欠乏条件下における共生糸状菌*Ct*と細菌群による協調的な植物生長促進

した(図 2)。秋から冬において、実験に用いたフィールドの土壌には、人工肥料を 5 年以上加えていないにもかかわらず可溶性リン酸は十分量存在した一方で、可溶性窒素が不足してい

たことが土壌分析から判明している。さらに、複数回の試験で土壌中の可溶性窒素の量と *Ct* 接種による植物成長促進の程度の間にも高い負の相関性が認められた。したがって、フィールド環境で *Ct* 接種時に観察された植物生長促進は、可溶性窒素が枯渇した条件での糸状菌と細菌群の共同作業によってもたらされていたことが示唆された。さらに、興味深いことに、シロイヌナズナの遺伝背景の違いによって共生効果がさらに強化され安定的に検出されることを発見しており、宿主植物による制御が、その共生機能を発揮させるために必要であることがうかがえた。

本研究により、実験室環境で植物微生物の共生系のモデルとして提唱した共生糸状菌がフィールド環境でむしろより効果的に働く場合があることを実証することができた。また、フィールド環境での発見を基に、共生糸状菌とパートナーと考えられる細菌叢が協調的に働くことで植物生長を促す事実およびその潜在的なメカニズムを再現可能な形で検証することが可能な実験系を構築することが出来た。さらには、植物への共生効果の発揮に協調的に働く微生物間の関係を明らかにしただけではなく、土壌・根圏微生物叢と根圏で競合することで植物の健康を保つ新たな共生糸状菌も発見した。微生物叢を現場で安定的に活用していくためには様々な角度からの検証が必要であるが、その検証に最適な人工微生物叢のモデル系を発見し整備できたと考えている。

研究テーマ B「共生から寄生と対照的な感染様式を示す *Ct* 菌株間での比較機能解析」

ゲノム情報の相違点が多くなる近縁種間の比較解析を行うよりも、同種でありながら、対照的な感染戦略を有する *Ct* 菌を比較解析することで効率よく共生・寄生に必要な因子を絞り込めると考えた(図 3, Hiruma et al., 2018)。そこで、上述した、共生から寄生と対照的な感染効果をシロイヌナズナに対して示す *Ct* 株の全ゲノム情報を新たに取得した。次に、得られたゲノム情報を活用した比較ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行った。植物側の遺伝子発現変動を調査した結果、感染初期に共生型と寄生型間で顕著な遺伝子発現応答の違いが認められたことから、共生・寄生の感染様式の決定はその初期段階で行われていることが考えられた。次に、本研究で取得した菌の全ゲノム情報を用いて菌側のトランスクリプトーム解析を行ったところ、共生型・寄生型が共通して有する菌ゲノム上の同一クラスターに座乗する毒素およびアブシジン酸 (ABA) 合成に関わる遺伝子群を、寄生型 *Ct* だけがその植物感染初期に活性化させることを見出した。毒素合成や ABA 合成に関わる遺伝子群が寄生型 *Ct* の宿主感染および寄生型 *Ct* による生長阻害効果の発揮に実際に必要であることを、合成経路内の複数の遺伝子を欠損させた菌変異体を用いた遺伝学的解析から証明した。植物感染微生物が植物ホルモンを産生する例はこれまでに報告されているものの、ジベレリンなど、ごく数例を除いてはその宿主感染時の役割は明らかになっていない。微生物による ABA 合成に関しては、40 年以上前から一部の植物感染糸状菌で知られていたが、その植物感染時における機能は全く不明であった。本研究により、菌由来の ABA が果たす感染時における役割の一端を明らかにできたと考えている。また、菌が合成する ABA は植物が合成する ABA と構造が同一であるため、宿主植物の保存された ABA 経路をターゲットとすることが考えられる。実際に ABA 関連経路に異常を持つシロイヌナズナ変異体においては寄生型 *Ct* 菌による寄生効果が有意に低下する。植物の広く保存された経路をターゲッ

トとした菌による宿主植物応答の攪乱行動は植物によって打破されにくいと考えられ、菌が ABA を用いることは理にかなった感染戦略であるように見える。しかしながら、*Colletotrichum* 属間および近縁の属菌間での比較ゲノム解析により、実際には ABA 合成酵素遺伝子群を持つ菌株はむしろ稀であることが判明している。今後、植物感染微生物が ABA などの植物ホルモン合成能を獲得した進化的な起源を明らかにすることに加えて、植

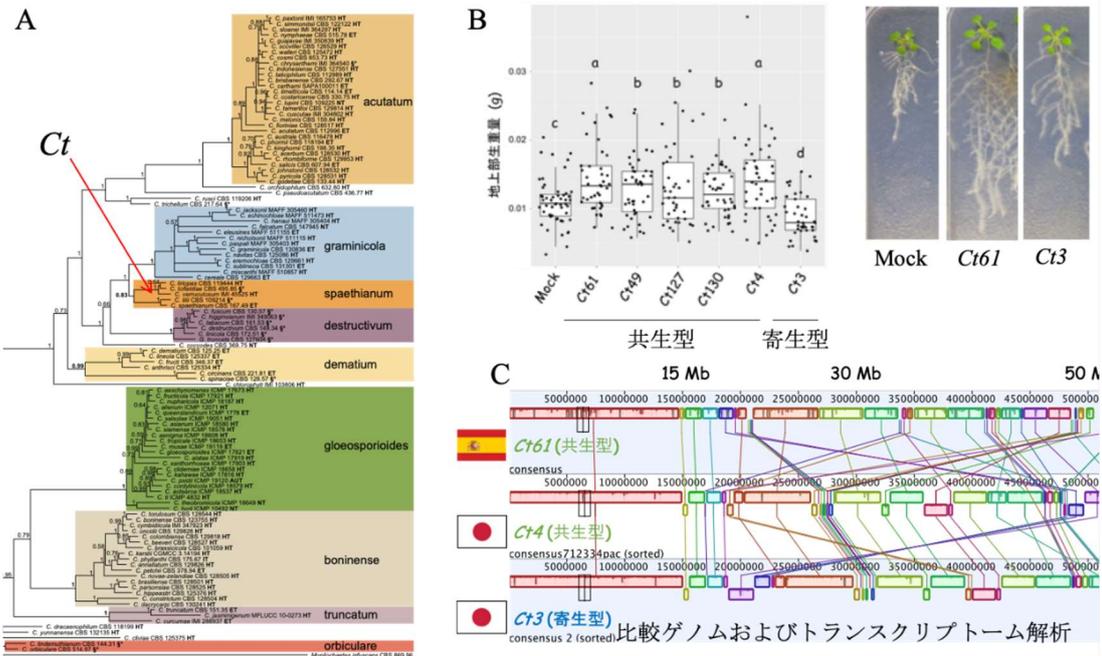


図3. 多彩な*Colletotrichum*属菌を活用した比較機能解析

- A. *Colletotrichum*属菌の系統樹 様々な菌株(15種類) をすでにテストしており、共生型から寄生型へと幅広い感染戦略を示すことを確認している
- B. リン欠乏条件において*Ct*株間での植物生長に与える影響の調査
- C. 共生型と寄生型*Ct*間での比較ゲノム解析の一例

物ホルモン合成を植物感染微生物が行うことのメリット・デメリットを多面的に明らかにしていく必要がある。最後に、共生型 *Ct* がその感染後期に特異的に誘導する植物遺伝子群に着目したところ、これまでその機能に関する解析が行われていない植物の高親和性リン酸トランスポーターが皮層細胞内の *Ct* 菌糸の周りに集積すること、および、*Ct* を介した植物地上部のリン蓄積および *Ct* による植物生長促進効果の発揮に必要であることを発見した。まとめると、寄生菌 *Ct* による寄生性発揮機構に加えて、共生菌 *Ct* による共生効果発揮機構の一端を明らかにした。

3. 今後の展開

今回、糸状菌と複数の細菌からなる人工微生物集団が窒素欠乏環境で植物の生長を著しく促進することを実験室環境とフィールド環境の双方で見出した。一方で、接種された植物個体の中には微生物集団による植物生長をうまく享受できない個体もある一定頻度で存在しており、それら個体では細菌の過剰増殖が起こっていることを示唆する結果を得ている。また、宿主の遺伝学的背景に応じて、共生に失敗したと考えられる植物個体が有意に減少し、植物が受ける

共生効果がさらに高まることから、人工微生物集団が宿主によって積極的に制御されている可能性を示唆する。今後は、異なるタイプの微生物群が根圏で集団を形成し、特定の共生効果を植物に発揮する仕組みを、その一つ一つのステップに切り分け、それぞれのメカニズムを詳細に解析する必要があると考えている。そのためには一細胞レベルでの菌および植物応答のイメージング解析や数理生物学の知見も積極的に取り入れていく必要があると考えている。また、同時に、得られた人工微生物集団を活用して様々なフィールド環境での接種試験も産業界も含めて協力して行うことで、人工微生物集団による共生効果発揮機構を理解するための基礎知見が得られるだけでなく、微生物を資材として活用するためのノウハウが蓄積されることが期待される

今回、*Ct* 株間での比較解析により、新たな植物・菌因子の発見につながった。今後は、*Ct* 株間での比較解析に加えて、近縁の *Colletotrichum* 属の糸状菌にも比較解析を広げ、共生・寄生に関与する植物・菌因子を網羅的に単離していきたい。共生・寄生と一口で言っても、それぞれの実際の感染様式は実に多彩であることから、異なる植物経路をターゲットとする新たな菌因子や環境適応に必須な新規植物因子を多数同定できると期待している。実際に、上記で報告した成果に加えて、共生菌 *Ct* によるリン欠乏における植物成長促進効果に植物の鉄欠乏応答トランスポーターである IRT1 およびマスター転写因子 FIT が必要であること、および、これら鉄欠乏関連因子が上述の高親和性リン酸トランスポーターなどの *Ct* 共生に必要な遺伝子群の転写を *Ct* 感染時特異的に制御することを見出している。さらには、これまでに得られた共生時に顕著に誘導される植物因子を目印とした順遺伝学的なアプローチも同時に組み合わせて解析したい。

4. 自己評価

本研究では、窒素枯渇条件において複数の種類の異なる微生物(微生物叢)が協調的に植物生長を促すことをフィールド環境で発見しただけでなく、その効果を再現可能な実験系を実験室環境で構築することに成功した。ほとんどの植物微生物叢の先行・類似研究がいまだに、特定の植物種の微生物のカタログ化や、微生物叢の構成を制御する宿主基盤の探索にとどまっていることを踏まえると、微生物叢としての有用機能の一つを発見した意味で本研究は大きな前進であると考えている。特に、今回は共生糸状菌(カビ)が共生微生物叢形成に決定的な役割を担っていることから、糸状菌研究が細菌と比べて技術的に困難であるという理由で細菌叢研究に集中している現在の植物微生物叢の研究トレンドに一石を投じる成果だとも考えている。また、以上の成果は、さきがけ研究開始時に想定していたリン欠乏環境を想定するだけではもたらされず、フィールド環境での共生微生物と植物の相互作用関係を理解したいというモチベーションがきっかけとなって明らかにされた。以上からも、本さきがけ領域での目的の一つであるフィールド環境での植物研究の重要性をある程度示すことが出来たと考えている。

さらに、同じくフィールド環境で単離された *Ct* 菌株間での比較解析を切り口として、シロイヌナズナを活用できるため比較的容易である植物側の基盤だけではなく、菌の寄生性感染戦略を支える想定外の菌側因子の同定にまで到達できた点は目的以上の成果だと考えている。以上の研究成果は、現在投稿準備中であり専門研究領域の内外にインパクトを与える内容として報告すべく最善を尽くす。

雇用した技術補佐員の方は微生物接種の条件検討をフィールド・制御環境双方で行う本研

究に合致した適性・技術・経験を有しており研究推進に大いに貢献された。一方で、実験室内だけではなくフィールドでの研究を最速で行っていくためには、研究協力者の人員が足りていなかった。適切な人員を適切なタイミングで本体制に組み込めなかった点については反省し今後改善していきたい。

社会・経済への波及効果については、共生微生物群を圃場環境で適応していくためにヒントとなるデータが得られた。一方で、今回の研究の中で、過剰な人工肥料を加えた場合は、*Ct* 接種による共生効果が確認されないなど、産業革命以降の既存の農業システムと統合していく上で課題も見えてきた。これらの問題は研究者個人では解決していくことには限界があるため、今後は産業界も含む様々な異分野の研究者とも共同で解決していきたい。さらには、植物を加工するためや植物に付加価値を付加するために微生物を活用する使用法の例も本研究を通じて見えてきた。加工および付加価値を付与するアプローチはそのターゲットが比較的明確であり想定される変数もフィールドでの微生物利用を目指す場合と比較して少ないことが予想されることから、実際の社会実装までの距離がより近いかもしれない。以上、微生物利用の促進に向けて課題は山積みではあるが、本研究は、実社会への研究成果の還元を目指す方向性においても、大きな一歩であったと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shinya T, Yasuda S, Hyodo K, Tani R, Hojo Y, Fujiwara Y, Hiruma K, Ishizaki T, Fujita Y, Saijo Y and Ivan G (2018). Integration of danger peptide signals with HAMP signaling amplifies the anti-herbivore defense responses in rice. *Plant J* 94, 626–637.
2. Okamoto-Yoshiyama K, Aoshima N, Takahashi N, Sakamoto T, Hiruma K, Saijo Y, Hidema J, Umeda M, Kimura S (2020). *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1* acts as a regulator coordinating crosstalk between DNA damage response and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 103, 321–340.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. *Hiruma K, Kobae Y and Toju H (2018). Beneficial associations between Brassicaceae plants and fungal endophytes under nutrient-limiting conditions: evolutionary origins and host-symbiont molecular mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* 44:145–154. (総説) * 責任著者
2. *Hiruma K (2019). Roles of plant-derived secondary metabolites during interactions with pathogenic and beneficial microbes under conditions of environmental stress. *Microorganisms*, 7(9),362. (総説)
3. Hiruma K. The beneficial associations between a root-associated fungal endophyte and Brassicaceae vegetables in field (The 30th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2019) 2019, Wuhan, China 16–21 June, 2019). (招待講演)

4. Hiruma K. A comparative analysis between closely-related plant mutualistic and parasitic fungi (23rd Evolutionary Biology Meeting at Marseille, Marseille, France 24-27 Sep., 2019). (招待講演)
5. Hiruma K. Transition between pathogenic and mutualistic lifestyles of Colletotrichum fungi associated with plant roots (Sino-German Symposium: Microbiomics and Plant Health, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China 24-30 Sep., 2018). (招待講演)

研究報告書

「遺伝育種の拡張に向けた種間隔離メカニズムの解明」

研究タイプ：通常型

研究期間：2016年10月～2020年3月

研究者：藤井 壮太

1. 研究のねらい

育種は遺伝資源を活用し、生物を遺伝的に改良するプロセスである。人類は育種によって困難な環境での作物栽培を可能にしてきた。しかしその一方で、栽培種は人為的選抜によって必ず強烈な遺伝的ボトルネックを経験しているため、遺伝的多様性の多くが失われている。そのため野生種との種間交雑による有用遺伝子の栽培種への移植が作物改良の主たる戦略である。さらに昨今の世界規模での気候変動や人口増加の結果、これまで以上に非耕作地に適応した作物の育種が求められている。従って野生の遺伝資源の利用は世界的なトレンドであり、これまで以上に雑種作出技術の需要は高い。また、倍数性育種による種間ハイブリッド作出は多種多様な耕地へ作物の適応を可能にしており、コムギ、セイヨウアブラナ、ワタなど成功例は枚挙にいとまがない。広い遺伝資源の活用が育種の本質であり、種苗は今後も農業分野をリードする市場になると考えられる。

それにもかかわらず種間雑種の作出が実証されてきた組み合わせパターンは極めて限定されており、また、これまでの研究ではなぜ(不)可能なのかという疑問を説明できる分子は多く同定されてこなかった。そして種間障壁は多次元の生理機構が関与する複雑な現象であり、システマティックにメカニズムを解明する試みが不足していた。Stebbins (1958) によって植物の様々なステージで生じる種間障壁が総括されており、この分類体系は現在でも本質的に変わっていない。一般に、種間の隔離障壁は、(1)受精前、(2)受精後の胚発生、(3)雑種生育や雑種不稔性等の生理要因に分解できる。例えば、2種の類縁が遠い場合は雌雄配偶子の受精すら不可能である。近縁種間で雑種が形成された場合でも生育不能や弱勢、そして不稔性が隔離障壁となる。

そこで本研究では、種間のハードルを自在に超越できる育種学の新展開を目指し、体系的な研究構成で種間の障壁の要因を特定する事を目標とした。種間の受精、雑種胚形成効率、あるいは雑種の生育能力に関与する障壁遺伝因子を同定することで、アブラナ科植物の種間交雑育種の基盤知識とすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

研究テーマ A: 自然変異を用いた種間障壁因子の同定

本研究ではモデル植物のシロイヌナズナを用いることで、種間障壁機構の解明を目指した。シロイヌナズナと近縁アブラナ科植物の自然変異コレクションと、ゲノムワイド関連解析を用いて複数の生理機構における種間障壁因子の同定を行った。種間の受精、雑種胚形成効率、あるいは雑種の生育能力について全ゲノム SNP 情報が利用できる約 300 のシロイヌナズナ系統の形質評価を行った。GWAS によりいくつかの候補遺伝子座を見出し、ノックアウトを

利用して遺伝学的に機能証明を行った。明らかにすることができた遺伝子については機能解析を行い、種間障壁因子としての特徴づけを行った。

研究テーマ B: 新奇スクリーニング系による同種認識シグナル因子の同定

種間障壁のメカニズムの裏側には、そもそもどのようにして同種の花粉が雌蕊に受け入れられるのかという基礎的な疑問がある。特にアブラナ科の雌蕊は”dry stigma”に分類されており、受粉時に雌蕊が水分を供給する事で花粉が初めて発芽できる仕組みである。このメカニズムの解明は種間不和合性の仕組みを紐解く鍵となる。そこで本研究では、雌蕊からの水分供給を引き起こす花粉成分を「同種シグナル因子」と位置づけ、その単離同定を目指した。

これまでの研究で、花粉の表層成分を感知して雌蕊が発光するレポーターシステム(Pollen Coat Compatibility Factor: PCCF アッセイ)を開発してきた。本研究では PCCF アッセイを用いて、同種シグナル因子の同定を目指した。変異源処理したシロイヌナズナの花粉をレポーターラインに受粉し、プレートリーダーを用いてシグナル活性を欠損した変異体のスクリーニングを行なった。得られた変異体について並列シーケンサーを用いて原因遺伝子を同定した。そして変異体と原因遺伝子の機能解析を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A: 自然変異を用いた種間障壁因子の同定

GWAS 解析により、シロイヌナズナの雌蕊において近縁アブラナ科種サンドストックの花粉管侵入に関わる *SPR11*

(*Stigmatic Privacy 1*)を見出した(図 1)。シロイヌナズナの *SPR11* をノックアウトしたところ、通常の野生系統はサンドストックの花粉の侵入を許さないが、*spr11* 変異体では花粉管が伸長することが明らかとなった。これは想定外ではあったが、植物が花粉管の侵入を負に制御するメカニズムを備えていることを示唆している。その他のアブラナ科種の花粉を *spr11* 変異体に交雑したところ、多くの種の花粉が侵入しやすくなっていることが明らかとなった。従って *SPR11* は花粉排除に広く関わっていることが考えられた。

植物種の半数以上は、同種内でも自己の花粉とは受精せず、非自己のみと受精して子孫を残す自家不和合性という性質を持っている。自家不和合種の雌蕊は自己の花粉で受精する自家和合種の花粉は受け入れないが、自家和合種は自家不和合種の花粉を受け入れる「種の一側性不和合性」という現象が古くから知られていた。本研究ではシロイヌナズナの進化の過程で少なくとも6回の独立の進化イベント

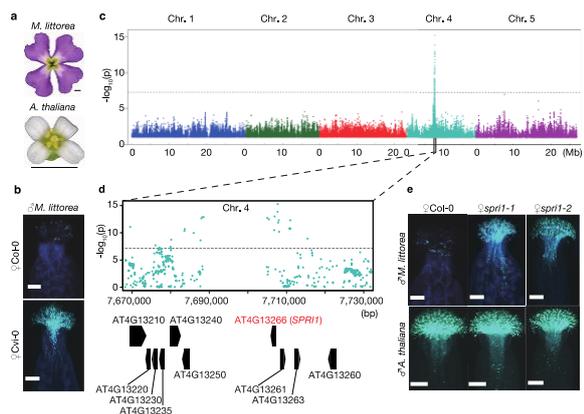


図 1 *SPR11* 遺伝子の同定 a. サンドストックとシロイヌナズナの花。bar = 2 mm. b. Col-0 と Cvi-0 にサンドストックを受粉し、アニリンブルー染色により花粉管を観察した。c. GWAS の結果。d. GWAS の結果の詳細図。ピーク直下に第 4 染色体の At4g13266 遺伝子(*SPR11*)が座乗していた。e. *spr11* 変異体ではサンドストック花粉の伸長が見られた。

トにより *SPR11* 遺伝子の機能が失われたことを見出した。*SPR11* は種間の一側性不和合性を分子レベルで説明できる遺伝子であると考えられた。また、ゲノム編集法により、*SPR11* タンパク質は自家不和合性を引き起こす分子メカニズムとは完全に独立した働きを持つことを示した。

SPR11 タンパク質の機能を破壊した系統に、自種の花粉を受粉させるより前に異種の花粉を受粉しておくことで著しく受精効率が下がった。*SPR11* タンパク質は異種の花粉が混在する野外環境下での種間のせめぎあいにおいて重要な役割を果たしていると考えられた。本成果について論文をまとめ、受理された(Fujii et al. *Nature Plants* 2019)。

研究テーマ B: 新奇スクリーニング系による同種認識シグナル因子の同定

PCCF アッセイによるスクリーニングより、変異体 7 系統を見出した。シークエンス解析を行い、これら全ての変異体について原因遺伝子を特定した。そのうち 4 つの系統が細胞内膜の制御に関わる同一の遺伝子内に変異を持っており、原因遺伝子であることが示された。

3. 今後の展開

近年、農業への期待は多様化しており、収量、品質、機能性などの向上や変動する地球環境に適応した作物の開発が求められている。種の壁を司る *SPR11* 遺伝子をゲノム編集や遺伝子組換えによって人為的に改変し、新しいハイブリッドを作出する技術の発展を目指したい。また、*SPR11* タンパク質の機能を特異的に阻害する化合物を用いることにより、種の壁を化学的に制御することも目指している。*SPR11* は花粉を排除する新しいメカニズムであるため、さらに機能を解明することでハイブリッドを作出するための新しい技術に発展する可能性もあると考えている。*SPR11* の発見を足場とし、育種の効率の向上と新たな機能を備えた有用作物開発のための技術基盤確立を目指す。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究では、*SPR11* という新規分子を見出すことができ、植物生殖の新たな側面を見出すことができた。また、現在解析中ではあるが、*SPR11* の他にも複数、種の障壁となる因子を発見している。これらの成果は当初提案した遺伝学的なアプローチが妥当であったことを証明している。特に *SPR11* は植物学のみならず今後の生物学において鍵分子となると考えている。研究には開始から学生を含め述べ 6 名の実験補助者が関わったが、現在準備中で未発表の成果も鑑みるとチームの運営は効果的であったと考えられる。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

SPR11 の発見は植物分野では最も権威が高い *Nature Plants* 誌に掲載され、朝日新聞社を含む複数の機関において報道された。また、植物学分野で最も大きな学会のひとつである International Conference for Arabidopsis Research の 2021 年シアトル開催大会他、複数の研究集会においてスピーカーとして招待されている。種の壁を説明できる分子を初めて同定した社会的なインパクトは大きいと考えており、品種作出、知財など直接的な経済活動につながる可能性は十分に高いと考えている。

論文公表後、*SPR11* の解析と制御に関して国際的な競争が始まったと認識している。材料や解析の進展において当該研究チームに大きな利があると考えているが、昨今の科学界の

事情を鑑みるとアメリカと中国の研究チームの追従が想定される。特に雌蕊因子 SPRI1 に対する花粉因子の同定は大きな目標であり、実現に向けて力を入れている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Fujii S. et al. 「Parallel evolution of dominant pistil-side self-incompatibility suppressors in <i>Arabidopsis</i> .」 <i>Nature Communications</i> 2020, 11, 1404. |
| 2. Fujii S. et al. 「A stigmatic gene confers interspecies incompatibility in the Brassicaceae.」 <i>Nature Plants</i> 2019, 5, 731-74. |
| 3. Fujii S., Shiroto Y. 「Molecular identification of the causal locus for the petaloid phenotype in <i>Daucus carota</i> .」 <i>Breeding Science</i> 2019, 69, 186-188. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数：0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Fujii S., Takayama S. 「Expanding the RNase world」 *Nature Plants*, 2020, 6, 53-54.
2. 藤井壮太, 高山誠司 「植物が異種の花粉を排除する仕組みを発見」 *バイオサイエンスとインダストリー*, 2020, 20, 14-17.
3. 藤井壮太 「ゲノムワイド関連解析による異種花粉識別分子の発見」 第 51 回種生物学シンポジウム、宮崎、2019/12/6-8 (招待講演)
4. 藤井壮太 「異種の花粉を選択的に排除する分子メカニズム」 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡 2019/12/3-6 (招待講演)
5. プレスリリース 「同種と異種の花粉を区別する分子を発見 ～種の壁を自在に制御する技術の開発に期待～」 2019 年 7 月 2 日 (関連する新聞記事: 奈良新聞(2019/7/3)、農業共済新聞(2019/7/3)、日経産業新聞(2019/7/6)、朝日新聞(2019/9/12、2020/1/12))

研究報告書

「遺伝子情報に基づく表現型予測モデルの構築とコンピューターシミュレーション育種への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 山本 英司

1. 研究のねらい

気候変動などの環境変化や人口増加による食料不足、あるいは社会の発展に伴う消費者ニーズの多様化など、日本を含む世界が抱える食料問題の解決には栽培技術の向上だけでなく、植物そのもののパフォーマンスを上げること(新品種開発)が重要である。実際に品種を開発する上では、収量性や品質性、栽培地域や作型に代表される環境適応性など、様々な要素を高水準で兼ね備える必要がある。これらは各々が多数の遺伝子に制御される複雑形質であるだけでなく、互いに相互作用も示すため、これらを迅速かつ効率的に同時改良することは現在の育種法では困難である。申請者らはこのような問題を解決するために、ゲノム情報に基づく表現型予測モデル(GSモデル)とコンピューターシミュレーションを利用した育種計画設計を提案し、トマトの果実糖度と収量の同時改良を例とした研究を行っている(Yamamoto et al. 2016)。しかし、このような手法をさらに多数の形質に応用するには、連鎖崩壊に伴う表現型予測精度の低下や形質間相互作用(遺伝子座の多面発現性)の説明に対する曖昧さなど、現在用いられているGSモデルの問題点を克服する必要がある。

本研究では、多数の形質の迅速かつ効率的な改良を実現する基盤として、全ゲノム配列解読によって解析集団に含まれる遺伝子アリルを検出、この情報をもとに選抜されたマーカー群を説明変数としたGSモデルを構築する。さらには、そのGSモデルとコンピューターシミュレーションによって多数形質を同時改良する効率的な育種計画を設計し、その実証実験を開始する。本研究で得られる一連の解析技術および知見は他の作物種にも応用可能であり、将来的には幅広い作物種の品種開発を通して、日本を含む世界の食料問題解決に貢献することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

日本国内の大玉トマトF1品種群(*Solanum lycopersicum*, 99品種)の全ゲノム配列を解析し、ゲノムワイド関連解析(GWAS)によって農業形質に関連する多数の遺伝子座を検出した。GWASによって検出された有意シグナルからGSモデル構築に用いるマーカーを選抜しGSモデルを構築した。従来のゲノムワイドなマーカーを使ったGSモデルとの間で予測精度の比較を行った結果、選抜マーカーを用いたGSモデルが実際の育種過程の集団においても高い精度を維持していることを示した。トマトのように表現型調査に多大な労力を要する作物においては、規模の小さいデータであっても精度の高いGSモデルを構築する必要がある。そこで、個体別の環境情報を取得するセンシングシステムを開発し、このシステムから得られる環境情報を用いたGSモデルの精度向上も行った。

(2) 詳細

① 全ゲノム配列解析および GWAS

トマト品種群(96 品種)のゲノム配列解読には Illumina HiSeq X を用いた。リード数の平均深度は 40.6x (26.5~54.8x) であり、これはヘテロ遺伝子型のコールに推奨されている深度 (21x) を上回っている。またトマト参照配列に対するカバレッジも平均 99.4% (96.6~99.8%) と高い値を示した。トマト参照配列へのマッピングおよびバリエーションコールを行った結果、1,714,257 ヶ所の変異サイトを検出した。果実糖度などの農業関連形質に対して GWAS を行ったところ、各形質に対して多数の有意シグナルを検出した(図1)。一方、検出されたシグナルの中で既報の遺伝子に該当するものはなく、統計値と変異情報のみを用いた原因遺伝子の特定は困難であった(図2)。例えば、果実糖度に対して検出された第9染色体上の有意シグナルは、トマト果実糖度の向上に寄与することが知られている *Lycopersicon Invertase5* (*LIN5*) の近傍に座乗していたが、今回用いた品種群において *LIN5* の塩基配列に変異は認められず、有意シグナルも *Lin5* より染色体上流側に位置していた(図2)。

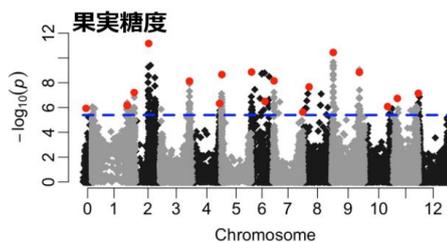


図1. 国内大玉トマトF1品種の全ゲノム配列を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) . 破線は5%有意水準を示す. ●で示されたプロットは、以降のGSモデル構築に用いられたマーカーを示す.

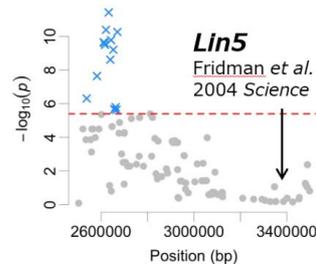


図2. 果実糖度のGWASにおいて第9染色体上に検出されたピーク. 本研究で検出されたピークは、他の研究でよく検出される *Lin5* 遺伝子とは異なる場所に位置している.

② 表現型予測モデルの構築とその精度評価

高い予測精度を示す GS モデルの構築には、表現型と関連するマーカーがより多く含まれること、表現型とは無関係のマーカーができるだけ排除されることが望ましい。①で実施した GWAS の結果、果実糖度に対しては 17 ヶ所、収量に対しては 12 ヶ所の遺伝子座を検出した(図1)。もしこれら GWAS の結果が妥当であるならば、検出された遺伝子座上のマーカーを用いた GS モデルは、ゲノムワイドなマーカー(本研究では全ゲノム配列)を用いた GS モデルよりも予測精度が高いはずである。そこで、①の GWAS の結果に基づいて GS モデルのためのマーカー選抜を行い(図1)、その表現型予測精度の検証を行った。予測精度の検証には、モデル構築に用いた 96 品種とは異なる 49 品種の大玉トマト F1 品種を用いた。予測モデルトレーニング用の表現型は 2011~2014 年にかけて、テスト用表現型は 2018 および 2019 年に取得した。比較を行ったほとんどの形質において、選抜マーカーに基づくモデルが従来の全ゲノムに基づくモデルの予測精度を上回った(図3)。この結果は、全ゲノム配列に基づく GWAS が診断バイアスに由来する偽陰性を回避することで適切なマーカー選抜を可能とし、これによって GS 予測精度を向上させられることを示している。なお、2018 年の収量に対する GS 予測精度は 0 となっているが、これは同年に発生した異常気象の影響と考

えられる。

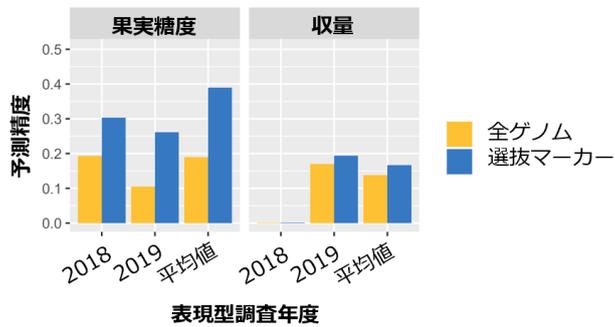


図3. 全ゲノム配列を用いたGSモデル（全ゲノム）とGWASにより選抜されたマーカーを用いたGSモデル（選抜マーカー）の予測精度比較. GSモデルは大玉トマト F_1 品種96点のデータを用いて構築した. 予測精度はGSモデル構築用とは異なる大玉トマト品種49点のデータを用いて評価した. 予測精度は予測値と実測値との相関係数. 平均値は2018年度と2019年度の実測値の平均値.

③ 育種過程におけるGSモデルの利用

一般に、交雑回数の増加に伴ってGSモデルの予測精度は低下するが、これは複数世代先までの育種効果を予測するシミュレーション育種設計では深刻な問題となる(図4a)。この問題は、ランダムに選ばれたマーカーではなく、表現型のバリエーションの原因となる変異、あるいはそれらと強い連鎖関係にある変異をGSモデル構築に用いることで理論上回避できる(図4a)。本研究で選抜されたマーカーに基づくGSモデルの予測精度を、交雑の進んだ育種集団を用いて評価したところ、従来のランダムに選ばれたゲノムワイドマーカーを用いたGSモデルと比較して、交雑の進んだ世代でも高い予測精度を維持していた。これにより、本研究で用いた手法が複数世代の連続交雑を想定したシミュレーションベースの育種設計に適用可能であることを示した。

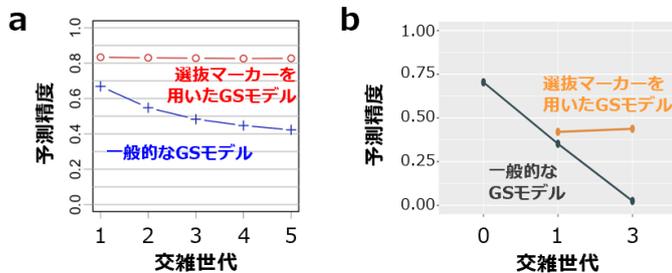


図4. GSモデルの予測精度と育種交雑世代との関係.
 a. GSモデル予測精度と交雑世代数との関係のシミュレーション.
 b. 果実糖度に対するGSモデル予測精度の比較. 交雑世代0はマーカー選抜そのものを実施した集団であるため、選抜マーカーを用いたGSモデルの予測精度評価は実施していない。

④ 個体別環境センシングによる形質評価およびGSモデル予測精度の向上

本研究でも示されたように、育種集団ごとに含まれる遺伝子資源は異なることが考えられる(図2)。そのため、GSモデル構築のための表現型調査は、集団が変わるごとに実施されることが望ましい。しかしトマトなどの園芸作物では、設備や栽培・収穫調査にかかる労力の問題から、小規模のデータであっても、より精度の高いGSモデルが構築できることが望ましい。そこで、個体ごとの日射量、気温、湿度、地温、土壌水分の環境条件を測定する環境セ

ンシングシステムを開発し、これら細かな環境バイアスが表現型値に与える影響を推定するとともに GS モデルへの反映を試みた。本試験の結果、環境が比較的安定していると期待される養液栽培ハウスにおいても、特に土壌水分レベルにおいて大きな違いが明らかとなった(図5a)。また、これら環境情報を GS モデルの説明変数に加えることで、表現型予測精度を向上させられることも示した(図5b)。

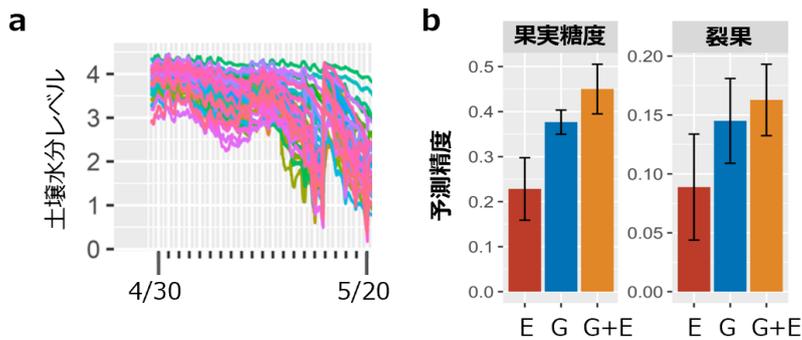


図5. 個体別環境情報の取得とGS予測モデルへの応用. **a.** ハウス養液栽培における個体ごとの土壌水分レベルの違い. **b.** 環境情報を用いた表現型予測. 予測精度は2分割交差検証における予測値と実測値との相関係数. E: 環境データのみ. G: ゲノム情報のみ. G+E: 環境情報とゲノム情報の両方を説明変数とした予測モデル.

3. 今後の展開

本課題で示した戦略は、民間種苗会社などと連携しながら、実際育種への展開を進めていく。また、環境センサーは生理障害など環境変化に高感受性な形質の遺伝解析に応用し、より複雑な形質に対するゲノム育種の実現を目指す。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

GS モデルのためのマーカー選抜には原因遺伝子の特定が望ましかったが、既知の遺伝子と対応しない、機能喪失型など明瞭な変異が存在しないなどの理由から思うように進まなかった。今後は、トランスクリプトームなど異なる情報を統合した解析が必要である。実際の育種過程における GS モデルの挙動は概ね期待通りであった。本研究で提案した戦略が実際の育種にどれ程貢献できるか、今後の実践によって示していく必要がある。

・研究の進め方

研究実施体制については、他機関との連携の強化や研究補助の増員などにより研究の範囲や展開をより進めるべきであったと省察している。研究費の執行状況は概ね順調である。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

データサイエンスに基づく作物育種は理論的効果が示されている一方で、その実装には予算・労力などの面で障壁が存在する。本研究で示したマーカー選抜や環境センサーを用いた GS モデルの精度向上は改良の必要性はあるものの、必要な予算・労力を抑えることで、データサイエンスに基づく作物育種に貢献しうると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

なし

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yamamoto E. “A high-density environmental sensing system revealed effect of point-specific environmental differences on phenotypes of greenhouse tomato.” *The 16th Solanaceae Conference*, Sep 2019, Israel
2. Yamamoto E. “Genome-wide association study, genomic selection and other technologies for tomato breeding in Japan.” *The 15th Solanaceae Conference*, Oct 2018, Thailand
3. 山本英司 情報科学を作物育種に利用する～展望と課題～ **第1回植物バイオインフォマティクス研究会**、2018年9月、神奈川
4. Yamamoto E. “Genome-wide association study, genomic selection and other technologies for tomato breeding in Japan.” *Plant & Animal Genome Asia 2018*, May 2017, Korea
5. Yamamoto E. “Application of whole-genome prediction in Japanese big-fruited tomato varieties.” *The East Asia Agricultural Genome Science Forum 2017*. Dec 2017, Korea

植物の免疫力を選択的に強化する化合物の開発

高岡 洋輔（東北大学 大学院理学研究科・講師）

研究課題名：「植物ホルモン活性のあいまい制御による環境応答バイオマーカー群の機能解明」

研究期間：2016.10～2020.3

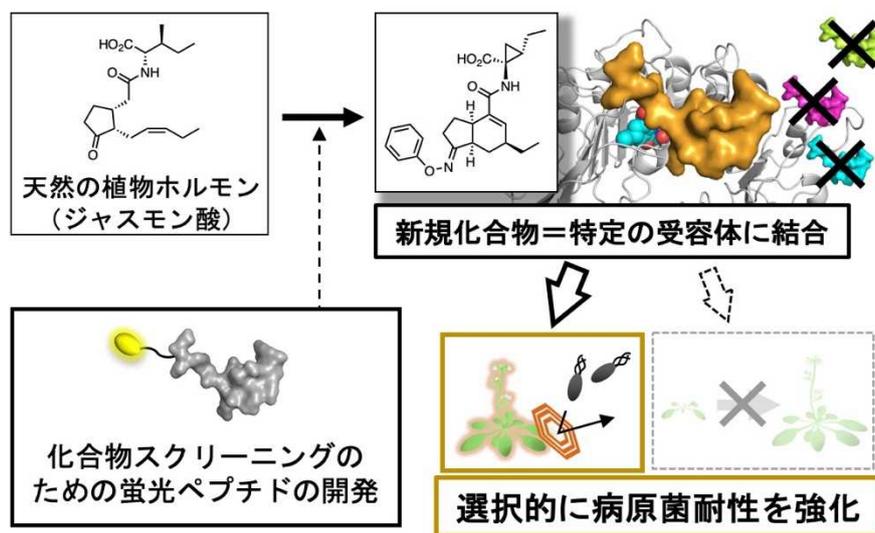


図 植物の生長を止めずに免疫力を強化する化合物の開発

天然の植物ホルモンであるジャスモン酸は、植物体内で複数の受容体と結合して、生長を止める代わりに病原菌や虫などに対する免疫力を強化させる働きを持つ。今回、特定の受容体とのみ結合する化合物をスクリーニングするための新手法を開発し、計算化学による構造最適化を経て、ジャスモン酸の持つ活性のうち免疫力強化を選択的に促す新規化合物を見出すことに成功した。

植物は病原菌に感染すると、ジャスモン酸と呼ばれる免疫ホルモンを分泌して身を守ろうとしますが、この防御に必要なエネルギーを産生するため生長を停止させます。この生長と防御のトレードオフの関係については、制御が複雑なため不明な点が多く残されています。ジャスモン酸には植物体内で結合する受容体が複数あり、このことが生長阻害や防御応答などの様々な応答を一つの分子が同時に引き起こす要因となっています。本研究では、この複雑な活性を切り分けることを目指し、まず受容体の一端に蛍光分子を組み込んだ「蛍光修飾ペプチド」によって化合物をスクリーニング(選別)する方法を新たに開発しました。さらに計算化学による構造最適化を行うことで、2種類の受容体のみ結合する分子の開発に成功しました。この分子は、モデル植物の生長を止めることなく、病原菌感染への抵抗性をもたらす免疫強化剤となることが確かめられました。この成果は、植物の生長と防御

の複雑な制御メカニズムの解明に近づくものと期待されます。

>>参考情報

論文

1. Takaoka Y., et al. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3654.
2. Takaoka Y., et al. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 5074-5081.
3. Takaoka, Y., et al. *Methods Mol. Biol.* 2020, 2085, 145-160.

受賞

1. 「バイオ関連化学シンポジウム講演賞」(2019)
2. 「植物化学調節学会 奨励賞」(2019)

プレスリリース

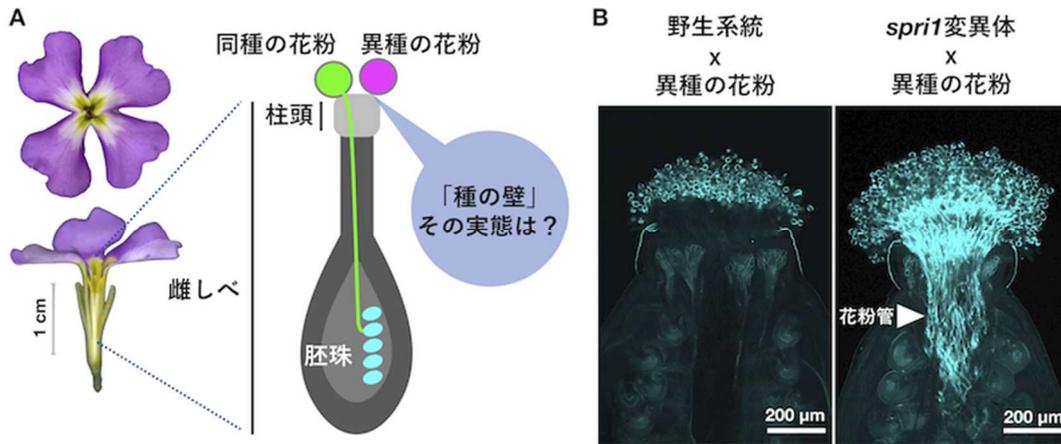
1. 「植物の病原菌感染を防ぐ画期的な植物免疫強化剤を開発」(2018年9月)

<https://www.sci.tohoku.ac.jp/news/20180918-9854.html>

モデル植物の研究から見つけた「種の壁」

藤井 壮太（東京大学 大学院農学生命科学研究科・助教）

研究課題名：「遺伝育種の拡張に向けた種間隔離メカニズムの解明」 研究期間：2016.10～2020.03



種の壁と Stigmatic Privacy 1

A. 植物の生殖過程では、花粉が雌しべの先端の柱頭に受粉し、伸長した花粉管が胚珠と結びつき受精して種ができる。これらの過程には種の壁があり、異種の花粉が排除されるメカニズムが存在する。B. 共焦点顕微鏡による花粉管の観察写真。SPRI1 遺伝子の機能を破壊した変異体は異種の花粉の伸長を阻害できなくなった。

生物は生殖の相手を選択するしくみをつくりだすことで、積極的に多様性を生み出したり、それを維持したりしてきました。植物には花粉と雌しべが互いを認識し、望ましいパートナーを選択するしくみが存在します。このようなしくみを操作できれば、新しい作物を作り出す技術につながります。しかし、これまでは種と種のハイブリッド作出を人為的に効率よく制御することができませんでした。その原因のひとつは、「種の壁」となる分子メカニズムが不明であったことにあります。

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを利用して、「異なる種」の花粉を排除するしくみが雌しべにあることを発見しました。Stigmatic Privacy 1 (SPRI1) と名付けた遺伝子とその排除の役割を担っており、この遺伝子を破壊すると異種の花粉管も雌しべのなかに伸びて入って入るようになることを明らかにしました。さらに、SPRI1 遺伝子によってコードされるタンパク質が機能するためには、どのようなアミノ酸配列が必要なのかも明らかにしました。今後、SPRI1 タンパク質に関わる分子メカニズムを標的として研究を展開することにより、自在にハイブリッドを作る方法が見つけられると期待されます。

>>参考情報

論文

1. Iwano M., et al. *Nature Plants*. 2015, 1, 15128.
2. Fujii S., et al. *Nature Plants*. 2016, 2, 16130.
3. Yasuda S., et al. *Nature Plants*. 2016, 3, 16206.
4. 藤井壮太, 高山誠司「被子植物における他種の花粉の識別システムおよびその進化の動態」*ライフサイエンス領域融合レビュー*, 2018, 7, e006.
5. Fujii S., et al., *Nature Plants*. 2019, 5, 731-741.
6. 藤井壮太, 高山誠司「植物が異種の花粉を排除する仕組みを発見」*バイオサイエンスとインダストリー*, 2020, 20, 14-17.

プレスリリース

1. 「同種と異種の花粉を区別する分子を発見 ～種の壁を自在に制御する技術の開発に期待～」(2019年7月)
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190702-2/index.html>